

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Detección de microsatélites trinucleótidos en  
Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819)**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo**

**AUTOR**

**Luis Gustavo Sanchez Silva**

**ASESOR**

**Blog.Roger Quiroz Bazan**

**Lima – Perú**

**2013**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mis padres y amigos incondicionales Martha Julia Silva Acasiete y Jorge Luis Sanchez Jarandilla quienes me enseñaron que no existe meta que no pueda lograrse con humildad y por ser mi fuente de inspiración y superación.

A mi segunda madre, mi abuelita Julia, quien me brinda respuestas extraordinarias, las cuales me impulsan a seguir adelante en todas las metas que me he trazado.

A mi segundo padre, mi abuelito Juan, quien me enseñó que nunca es tarde para lograr mis objetivos y que con fe, todo es posible.

A mi familia, porque sé que el logro de cada miembro, es el logro de todos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre, quien estuvo presente en los momentos malos y buenos de la manera más amorosa e incondicional.

A mi padre, quien particularmente en los momentos menos favorables, se acercaba a mí sin que mi madre lo note a preguntarme que sucedía y luego de una larga charla, terminaba motivándome. Nunca olvidare una frase que siempre me repetía en esos momentos: “siempre saca algo positivo incluso de las cosas negativas”.

A mi abuelito que desde el cielo, sé que intercede por mi familia antes Dios.

A mi abuelita que tuvo la oportunidad de criar a todos sus nietos y supo desde niños formarnos en un ambiente de amor para ser grandes personas.

Al Blgo. Roger Quiroz Bazan quien me abrió las puertas de su laboratorio en donde empecé a dar mis primeros pasos en el mundo de la biología molecular.

Al Blgo. Daniel Oré Saúl Chávez por su paciencia para brindarme los conocimientos que me sirvieron como punto de partida para la realización de esta tesis.

Al Dr. Ricardo Fujita Alarcón por brindarme su apoyo y darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio y poder continuar con la realización de esta tesis. Ahí, tuve la oportunidad de conocer a personas como la Dra. María Luis Guevara, Oscar Acosta y Verónica Mendoza, quienes además de su amistad, me brindaron sus conocimientos que me servirán a lo largo de mi carrera profesional.

A Lisette por estar presente en aquellos momentos donde necesité un empujón para seguir adelante y no dejarme caer.

A mis grandes amigos, a quienes no menciono por temor a olvidarme de alguno, pero que comparten conmigo muchos momentos alegres en mi vida.

Finalmente, a Dios por poner en mi camino a todas estas personas que de alguna u otra manera han servido de instrumentos para poder recibir su mensaje.

## **ABREVIATURAS**

AFLP	amplified fragment length polymorphism (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)
EST	expressed sequence tag (etiquetas de secuencias expresadas)
MAS	marker - assisted selection (selección asistida por marcadores)
mg	miligramos
mL	mililitros
mM	milimolar
ng	nanogramos
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
pg	picogramos
QTL	quantitative trait loci (loci de caracteres cuantitativos)
RAPD	random amplification of polymorphic DNA (polimorfismo de DNA amplificado al azar)
rpm	revoluciones por minutos
SNP	single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido simple)
SSC	solución salina de citrato de sodio
SSR	simple sequence repeats (secuencias simple repetitivas)
ul	microlitros

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	3
II.1.Posición taxonómica de la concha de abanico	3
II.2.Características de la concha de abanico	4
II.3.Distribución geográfica de la concha de abanico	5
II.5.Los marcadores moleculares	6
II.6.Los microsatélites	8
<b>III. OBJETIVOS</b>	21
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
IV.1.Lugar de Ejecución	22
IV.2.Extracción de DNA Genómico	22
IV.3.Construcción de Librerías genómicas	25
IV.4.Enriquecimiento de Librerías genómicas	28
IV.5.Ligación de insertos con vectores pCR®8/GW/TOPO®	30
IV.6.Transformación de células <i>E. coli</i> electrocompetentes con el vector pCR®8/GW/TOPO® y arreglo de colonias	31
IV.7.Selección de colonias positivas	32
IV.8.Obtención de DNA plasmídico para secuenciamiento	37
<b>V. RESULTADOS</b>	40
V.1. Extracción de DNA genómico	40
V.2. Generación de la librería genómica y enriquecimiento	40
V.3. Transformación de células electrocompetentes y arreglo de colonias	42
V.4. Selección de Colonias Positivas	43
V.5. DNA plasmídico de colonias para secuenciamiento	45
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	47
VI.1.Extracción de DNA genómico	47
VI.2.Generación de la librería genómica y enriquecimiento	47
VI.3.Transformación de células electrocompetentes y arreglo de colonias	48
VI.4.Selección de colonias positivas	49

VI.5. DNA plasmídico de colonias para secuenciamiento.....	50
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

## **ANEXOS**

ANEXO I - COMPOSICION DE SOLUCIONES .....	62
ANEXO II - COMPOSICION MEDIOS DE CULTIVO .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### MARCO TEÓRICO

Figura 1. Etapas de desarrollo de la concha de abanico. ....	4
Figura 2. Distribución de las principales poblaciones de concha de abanico a lo largo de la Costa de Perú y Chile. ....	5
Figura 3. Desembarques de concha de abanico peruana desde el año 1978 al 2006. ...	6
Figura 4. Polimorfismo de longitud de los microsatélites .....	10
Figura 5. Representación esquemática de la detección de insertos pequeños para aislar microsatélites. ....	12
Figura 6. Generación de una librería genómica. ....	13
Figura 7. Diagrama del enriquecimiento de la librería genómica con una sonda microsatélite biotinilada (CAT) <sub>7</sub> . ....	14
Figura 8. Captura de esferas magnéticas. ....	14
Figura 9. Vector pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> .....	15
Figura 10. Ligación de los producto de PCR al vector pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> activado facilitado por la enzima Topoisomerasa I. ....	16
Figura 11. Southern Blot .....	17
Figura 12. Detección colorimétrica de colonias positivas. ....	18
Figura 13. Primera selección .....	18
Figura 14. Secuencia del vector pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> .....	19
Figura 15. Porcentajes de secuencias disponibles del genoma de bivalvos .....	20

### MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 16. Ubicación de los tejidos de la Concha de Abanico .....	23
Figura 17. Lavado de tejidos por separado .....	23
Figura 18. Lisis de tres tipos tejidos y con dos tipos de buffer. ....	24

### RESULTADOS

Figura 19. Extracción comparativa de DNA utilizando dos tipos diferentes de buffer de lisis. ....	40
---	----

Figura 20. Reacciones de digestión, desfosforilación y ligación al adaptador del DNA genómico .....	41
Figura 21. Librería genómica y enriquecimiento .....	42
Figura 22. Células electrocompetentes transformadas. ....	42
Figura 23. Arreglo de 137 colonias en una placa petri utilizando una cuadrícula como guía. ....	43
Figura 24. Primera selección de colonias positivas .....	43
Tabla 1. Resultados del conteo de las colonias positivas y negativas a partir de la primera selección .....	44
Figura 25. Geles de agarosa luego de liberar el inserto del DNA plasmídico:.....	44
Figura 26. Segunda selección de colonias positivas.....	45
Tabla 2. Resultados del conteo de las colonias positivas y negativas a partir de la segunda selección.....	45
Figura 27. DNA plasmídico de las colonias seleccionadas para secuenciamiento. ....	46



## RESUMEN

La concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) es un molusco bivalvo de importancia económica para el Perú, debido a su alto valor nutritivo y su amplia aceptación en los mercados de Estados Unidos, Japón y Europa. En el Perú, no se han realizado estudios a nivel genético poblacional en esta especie, existiendo solamente estudios morfométricos, cuyas variaciones estarían ligadas a cambios en la variabilidad genética del recurso (Cisneros *et al.*, 2008). Además, existen pocos marcadores microsatélites reportados, los cuales son los marcadores moleculares más adecuados para evaluar la diversidad genética de una especie. El objetivo del presente estudio fue detectar microsatélites trinucleótidos “CAT” del genoma de *A. purpuratus* para lo cual se utilizó el método de librerías genómicas enriquecidas. Se optimizó un protocolo para extracción de DNA Genómico de alta calidad a partir de la gónada masculina y utilizando como buffer de lisis TNES-urea. Asimismo, se construyó una librería genómica enriquecida utilizando esferas magnéticas lo que permitió obtener un elevado porcentaje de clones positivos (65-80%). Finalmente, se obtuvo DNA plasmídico de alta calidad cuyo secuenciamiento servirá para diseñar cebadores que permitan evaluar el polimorfismo de los microsatélites.

Palabras clave: concha de abanico, *Argopecten purpuratus*, librerías genómicas enriquecidas, microsatélites, polimorfismo.

## ABSTRACT

The Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) is an economically important bivalve in Peru due to its high nutritional qualities and its wide acceptance in the markets of United States, Japan and Europe. In Peru, there have not been studies of this resource at the population genetic level and there are only morphometric studies, one of those reports that variations at this level could be linked to the genetic variability of the resource (Cisneros *et al.*, 2008). In addition, there are only few microsatellite markers reported, this molecular markers are the best to assess the genetic diversity. Due to this reason, the aim of this study was to detected trinucleotide microsatellites with the motif "CAT" from the genome of *A. purpuratus* using enriched genomic libraries. High quality DNA extraction from the male gonad with TNES-urea lysis buffer was optimized. Furthermore, the enriched genomic libraries constructed using magnetic beads allowed identification of a high percentage of positive clones (65-80%). Finally, the sequencing of the high quality plasmid DNA obtained will enable primers design for the evaluation of the microsatellites polymorphism.

Keywords: Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus*, enriched genomic libraries, microsatellite, polymorphism.

## I. INTRODUCCIÓN

La Concha de Abanico, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) es una especie de molusco bivalvo de gran importancia económica, de alto valor nutritivo y de amplia aceptación en mercados de Estados Unidos, Japón y Europa. En el Perú, aún no se han realizado estudios a nivel genético poblacional en esta especie, existiendo solamente estudios morfométricos, cuyas variaciones estarían ligadas a cambios en la variabilidad genética del recurso (Cisneros *et al.*, 2008). Instituciones como el Ministerio de la Producción y el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) intentan proteger el recurso considerando solamente estudios a nivel biológico, estableciendo cuotas de captura permisible y capturas con un mínimo de tamaño de 65 mm. Estos tipos de estudio pueden resultar insuficientes si se desea conservar un recurso biológico puesto que no se está considerando aspectos genéticos capaces de brindar datos de mayor consistencia en perspectivas de importancia como su comportamiento poblacional, grado de diversidad en los distintos bancos naturales y de qué manera su cultivo puede influenciar en la pérdida de diversidad.

La ausencia de marcadores genéticos o moleculares para evaluar la biodiversidad de nuestros recursos han limitado su estudio al uso de marcadores tradicionales como los morfológicos o fenotípicos que presentan serias desventajas por la presencia de mucha variación dentro de la especie, dependientes del ambiente, de la nutrición, etc; a diferencia de los marcadores moleculares las cuales son invariables a través del ciclo de vida del individuo. Aún no existe una cantidad adecuada de marcadores moleculares para poder llevar a cabo un estudio genético en el litoral peruano que permita estudiar y analizar cuáles son las unidades poblacionales y el flujo génico de la concha de abanico en éste.

Los marcadores microsatélites resultan de mucha utilidad para estudios de genética de poblacionales debido a que son multialélicos, altamente polimórficos y codominantes. Hasta el momento sólo se han reportado 29 loci microsatélites polimórficos (Pickerell *et al.*, 2004; Haye *et al.*, 2012; Mandiola *et al.*, 2012 y Marin *et al.*, 2012), que aún

restringe diversos estudios genéticos de la concha de abanico; por ello, es de mucha importancia aislar una mayor cantidad marcadores de este tipo.

El presente trabajo tiene como objetivo principal detectar microsatélites con el motivo trinucleótido “CAT” empleando el método librerías genómicas enriquecidas aprovechando la alta afinidad de las moléculas biotina y estreptavidina mediante captura magnética; éste método, es el que posee mayor eficiencia en comparación a otros métodos de aislamiento utilizadas en moluscos bivalvos (Zhan *et al.*, 2009). Del mismo modo, se intenta aportar una batería de DNA con nuevos microsatélites que deben ser evaluados para su uso en diversos estudios genéticos.

## II. MARCO TEÓRICO

Los bivalvos constituyen un importante componente de muchos ecosistemas bentónicos, capaces de soportar fuertes cambios físicos y químicos característicos de ecosistemas marinos y así lograr adaptarse a ellos (Kipra *et al.*, 2005).

El grupo más exitoso en comunidades bentónicas de bivalvos, los pectínidos; se encuentran distribuidos en todos los mares del mundo. Esta familia presenta una elevada cantidad de especies (Brand, 1991) con un aproximado de 225 repartidas en 56 géneros (Brand, 2006; Dijkstra y Maestrati, 2009). El registro fósil de la familia pectinidae data de comienzos del triásico (Waller, 1991) y su expansión ha traído como resultado la formación de diversos grupos, estando presentes en todos los mares del planeta y habitando en diversos ambientes desde zonas intermareales hasta zonas abisales (Puslednik y Serb, 2008).

En el Perú la producción global de pectínidos se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas, en el año 2001 la industria produjo más de 1.2 millones de toneladas métricas de pectínidos, aproximadamente 3.5 veces más que en 1990 (Uddin *et al.*, 2007). Este incremento ha influido en la salud poblacional del recurso, ya que el sobrepasar el número de capturas permisibles trae como consecuencia la disminución de las poblaciones (Pacheco y Garate, 2005; Mendo y Wolff, 2003; Tarazona *et al.*, 2007).

### II.1. Posición taxonómica de la concha de abanico:

Phylum: Mollusca  
Clase: Bivalvia  
Subclase: Pteriomorphia  
Orden: Pectinoida  
Superfamilia: Pectinoidea  
Familia: Pectinidae  
Subfamilia: Pedinae

Género: Argopecten

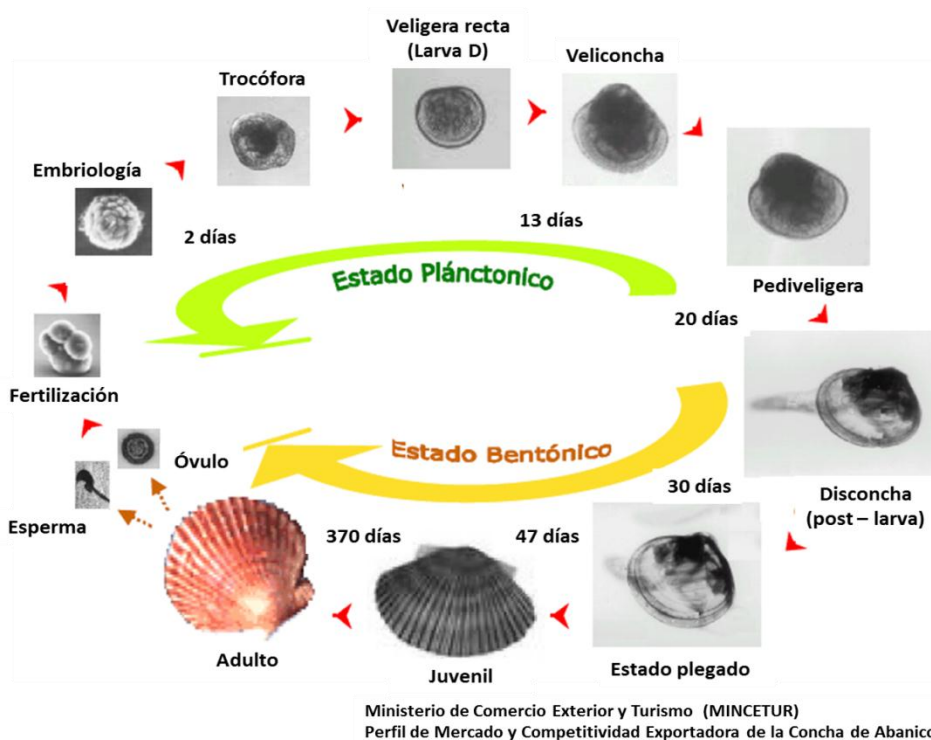
Especie: *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819).

Datos adquiridos de “World Register of Marine Species – WoRMS”

<http://www.marinespecies.org/>

## II.2. Características de la concha de abanico:

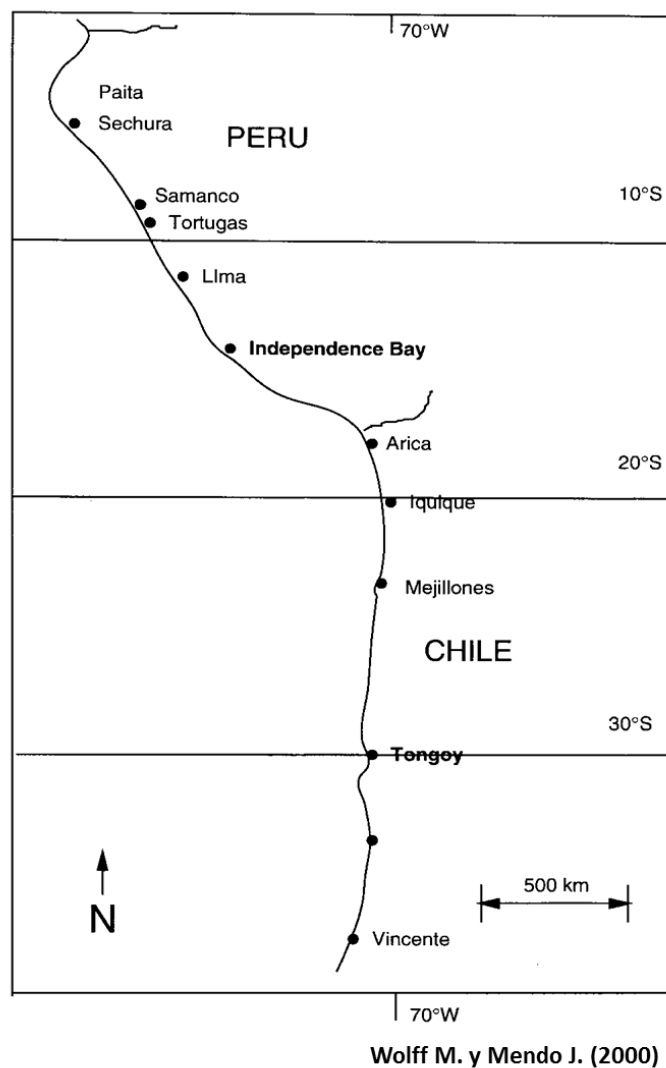
La concha de abanico es una especie bentónica, hermafrodita insuficiente, presenta fecundación externa, se alimenta por filtración (8 a 10 litros por hora) de micro algas y detritos orgánicos, posee valvas orbiculares con estrías y desova durante todo el año. Éste desove se acentúa con el aumento de la temperatura, como sucede durante eventos “El Niño” (Wolff, 1985). La concha de abanico es extraída de dos maneras: directamente de los bancos naturales (extracción silvestre) y a través de actividades acuícolas (maricultura). Su ciclo de vida consiste de dos estados, el estado planctónico y el estado bentónico, pasando por distintas etapas (**Figura 1**). En su madurez sexual la gónada masculina se torna de color blanco, mientras que la gónada femenina adquiere una tonalidad rojo ladrillo.



**Figura 1.** Etapas de desarrollo de la concha de abanico.

### II.3. Distribución geográfica de la concha de abanico:

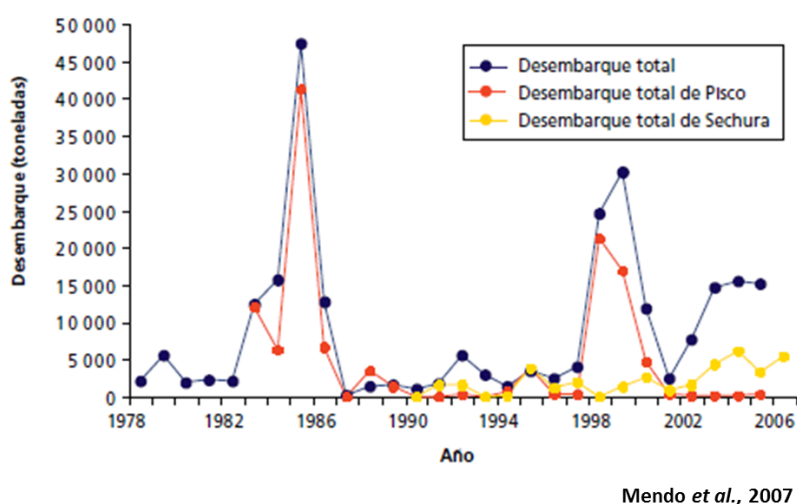
La concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) se distribuye en las bahías someras desde Paita en Perú (5°S, 81°W) hasta Tongoy en Chile (30°S, 71°W) (Wolff y Mendo, 2000) (**Figura 2**). Actualmente, las poblaciones más importantes en cuanto al tamaño y productividad se encuentran distribuidas en la Bahía Independencia (Perú) y Tongoy (Chile), separadas por 2000 kilómetros de línea costera. Las poblaciones pequeñas se encuentran localizadas en Sechura, Samanco y Tortugas en el norte del Perú y en las bahías de Arica, Iquique y Mejillones en el norte de Chile (Vildoso y Chirichigno, 1956; Osorio y Bahamonde, 1968).



**Figura 2.** Distribución de las principales poblaciones de concha de abanico a lo largo de la Costa de Perú y Chile.

#### II.4. Exportación de la concha de abanico:

La concha de abanico en el Perú se ha convertido en la última década en uno de los moluscos de exportación más importante con fuertes variaciones a comparación de inicios de los 80s (Mendo *et al*, 2007). Los desembarques anuales de este recurso en la costa peruana vienen mostrando elevadas fluctuaciones que van de la mano con la presencia de eventos “El Niño” (**Figura 3**).



**Figura 3.** Desembarques de concha de abanico peruana desde el año 1978 al 2006.

#### II.5. Los marcadores moleculares:

Los marcadores moleculares son secuencias de DNA que permiten observar variaciones alélicas como resultado de algún tipo de mutación que terminó por establecerse en una población a través del tiempo. Las variaciones alélicas son conocidas como polimorfismos y permiten separar poblaciones, especies, géneros o grupos taxonómicos mayores (Astorga, 2008). El objetivo principal de utilizar marcadores moleculares es obtener diferencias entre grupos a través de geles de agarosa, poliacrilamida o directamente de las secuencias de DNA.

Los marcadores moleculares pueden clasificarse en dos tipos:

**a. Basados en hibridación:**

- Se encuentran los RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), este método consiste en la obtención de fragmentos de DNA



utilizando endonucleasas de restricción. Los sitios de restricción así como la distancia entre ellos varía entre distintos grupos, los fragmentos generados son separados por electroforesis y analizados mediante Southern Blot utilizando sondas específicas.

**b. Basados en PCR:**

- PCR – RFLP: Posee el agregado de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a la técnica mencionada anteriormente. Utilizando cebadores universales se puede amplificar mediante PCR miles de copias del fragmento de DNA, el cual luego es analizado en un gel de agarosa. Es un marcador codominante.
- RAPD (polimorfismo de DNA amplificado al azar): consiste en amplificar mediante PCR regiones anónimas del genoma de la especie. El análisis poblacional suele ser rápido con este método; sin embargo, debe tomarse en cuenta que las condiciones de PCR no deben variar para evitar cambios en los distintos patrones de amplificación. Es un marcador dominante.
- AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados): este método requiere de endonucleasas de restricción junto con la amplificación de secuencias conocidas mediante PCR. Los fragmentos generados son visualizados en gel de agarosa y se analizan mediante presencia o ausencia de un locus. Este marcador es dominante.
- SNP (polimorfismo de nucleótido simple): son cambios en un solo nucleótido en una secuencia de DNA. Es un marcador codominante y muy abundante en el genoma, sin embargo su análisis resulta costoso.
- Microsatélites o SSR (Simple sequence repeats): Repeticiones cortas de nucleótidos que se encuentran distribuidos por todo el genoma.

## **II.6. Los microsatélites:**

Los microsatélites están dispersos de manera abundante en todo el genoma y se encuentran flanqueados por secuencias generalmente conservadas para cada especie. Las repeticiones ocurren en forma de un solo nucleótido o como interacción de nucleótidos usualmente llamados microsatélites, aquellos motivos mono-, di-, tri-, y tetranucleótidos son los principales tipos de microsatélites, aunque motivos penta- y hexanucleótidos también pueden ser clasificados dentro del grupo de microsatélites (Ellegren, 2004). Aquellas secuencias con mayor cantidad de interacción de nucleótidos que se repiten son clasificadas como minisatélites o en un caso extremo como DNA satélite.

### **II.6.1. Descubrimiento de los microsatélites:**

Hamada *et al.*, 1982 demuestran la existencia de elementos altamente repetidos y presentes en genomas de distintos organismos, desde levaduras hasta humanos; estos elementos consistían en repeticiones cortas en tándem y las cuales fueron denominadas como microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), se reporta además que en mamíferos el motivo repetido de mayor frecuencia era el de (CA)<sub>n</sub> y (TG)<sub>n</sub>. Tautz *et al.*, 1986 señalan que en muchos loci microsatélites existe una alta variación en el número de unidades repetidas que puede ser una herramienta muy útil para el test de identificación, estudios poblacionales, estudios de ligamiento y mapeo de genomas. Posteriormente, estos microsatélites son amplificados mediante PCR y analizados en geles de poliacrilamida utilizando un set de cebadores específicos a regiones flanqueantes únicas en el loci microsatélite, determinando variabilidad alélica (Weber y May, 1989; Litt y Luty, 1989).

### **II.6.2. Distribución de los microsatélites:**

Lagercrantz *et al.*, 1993 realizan un estudio para estimar la abundancia de microsatélites en plantas y lo comparan con los de vertebrados demostrando que la frecuencia de microsatélites varía ampliamente en distintos genomas. Primmer *et al.*,

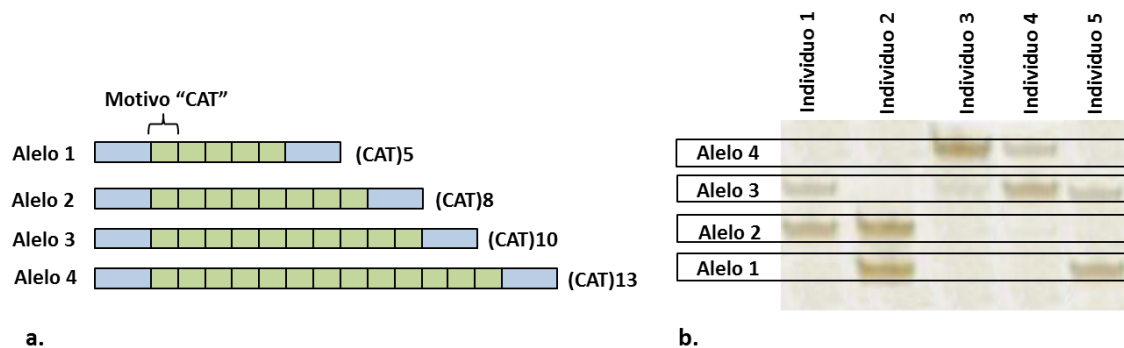
1997 señalan que existe una tendencia en el incremento de la densidad de microsatélites que va de acuerdo con el tamaño de los genomas; dos años después, Elgar *et al*, tomando como datos la abundancia de microsatélites en el genoma humano (Beckmann y Weber 1992), rechazan esta hipótesis al demostrar que a pesar de que el tamaño del genoma del pez globo (*Fugu rubripes*) es ocho veces más pequeño que el genoma humano, la frecuencia de sus microsatélites es 4.5 veces más abundante.

No existen secuencias disponibles de genomas completos para bivalvos por lo que la estimación exacta de una distribución de microsatélites aún no es posible, sin embargo, Cruz *et al.*, 2005 empleando métodos estadísticos, herramientas bioinformáticas y secuencias de bivalvos disponibles en la base de datos del NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) señalan que posiblemente para secuencias en intrones existen 245 loci por megabase, mientras que para exones existen 85 loci.

### **II.6.3. Características de los microsatélites:**

Existen muchas características que han hecho a los microsatélites los marcadores moleculares más utilizados, si bien es cierto, desde el punto de vista práctico, cuando no se tiene ningún tipo de conocimiento de la especie a analizar, el análisis en las poblaciones y aislamiento de microsatélites resulta en un costo moderado comparado con otros marcadores moleculares. Desde el punto de vista genético los microsatélites son codominantes lo que permite diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos, presentan herencia mendeliana simple y poseen un alto número de alelos por locus, lo cual nos indica su elevado nivel de polimorfismo. A diferencia de otros marcadores, el polimorfismo de los microsatélites proviene de la variabilidad en longitud de los motivos repetidos más que de la variabilidad en la misma secuencia (**Figura 4**). Además, otra de sus características más importantes es que cebadores desarrollados para una especie pueden amplificar los mismos SSR en una especie

cercanamente relacionada. Esta técnica denominada “amplificación cruzada” ha demostrado alta eficiencia para varias especies de peces (Rico *et al.*, 1996), sin embargo su eficiencia en bivalvos es bastante pobre, incluso para los EST – SSR, los cuales deberían estar aún más conservados ya que provienen de regiones codificantes (Zhan *et al.*, 2005). Su elevada tasa de mutación ( $10^{-3}$  por locus) (Ellegren, 2004) conlleva a los altos niveles de polimorfismo, que los hacen muy útiles para estudios de mapas de ligamiento, test de paternidad, genética forense, procesos demográficos (filogeografía), mapeo de locus cuantitativos (QTL), selección asistida con marcadores (MAS), conocimiento del índice de diversidad genética de las poblaciones, así como programas de mejoramiento de diversidad genética, entre otros.



**Figura 4.** Polimorfismo de longitud de los microsatélites:

**(a)** La longitud de los microsatélites puede variar en los distintos alelos presentes en una población, **(b)** estos alelos pueden ser leídos en geles de poliacrilamida, donde se separan de acuerdo a su tamaño (pares de bases).

#### II.6.4. Estrategias para la obtención de microsatélites:

Debido a su amplia aplicabilidad, existe un elevado interés en los microsatélites que se puede observar en la gran cantidad de trabajos publicados (Zane *et al.*, 2002). El tamaño de los genomas en bivalvos es mucho mayor en comparación con otros taxa (Saavedra y Bachére, 2006), sin embargo, la frecuencia de microsatélites en esta clase es baja (Hui *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007 y Zhang *et al.*, 2007). Existen tres estrategias utilizadas en muchos taxa para la obtención de microsatélites:

1. A partir de insertos pequeños provenientes de librerías genómicas.
2. De Librerías genómicas enriquecidas (Rassmann *et al.*, 1991)
3. A partir de secuencias disponibles en base de datos.

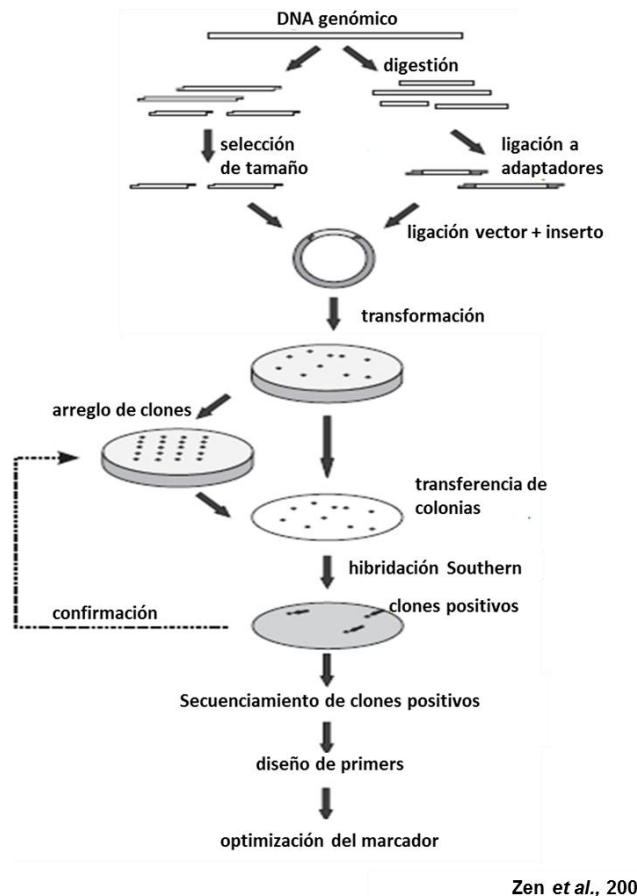
Zhan *et al.*, 2009 realizan una comparación de técnicas para aislar microsatélites en el bivalvo *Chlamys farreri*, llegando a la conclusión que la técnica de librerías genómicas enriquecidas es la técnica más eficiente.

#### **II.6.4.1. A partir de insertos pequeños provenientes de librerías genómicas:**

Tradicionalmente los marcadores microsatélites han sido aislados a partir de librerías genómicas (Zane *et al.*, 2002). El DNA genómico es digerido utilizando enzimas de restricción o por sonicación. El tipo de enzima de restricción dependerá del tamaño de fragmentos y del tipo de corte (cohesivo o abrupto) que uno desea obtener. Los fragmentos generados son seleccionados de acuerdo a su tamaño (preferentemente 300 a 700 pares de bases), luego estos insertos pueden ser directamente ligados a un vector o luego de una ligación previa a un adaptador. Una vez transformadas se pueden seleccionar aquellas colonias positivas utilizando sondas microsatélites. La selección de clones positivos es generalmente llevada a cabo por hibridación Southern Blot previa transferencia de colonias a membranas de nylon (**Figura 5**).

#### **II.6.4.2. A partir de bases de datos de EST:**

Los EST (expressed sequence tag) o “etiquetas de secuencias expresadas” son secuencias cortas que se obtienen mediante el secuenciamiento de DNAs complementarios. Debido a la rápida acumulación de EST en las bases de datos online, un conjunto de secuencias EST - SSR resulta muy económica en comparación a otras técnicas de caracterización.



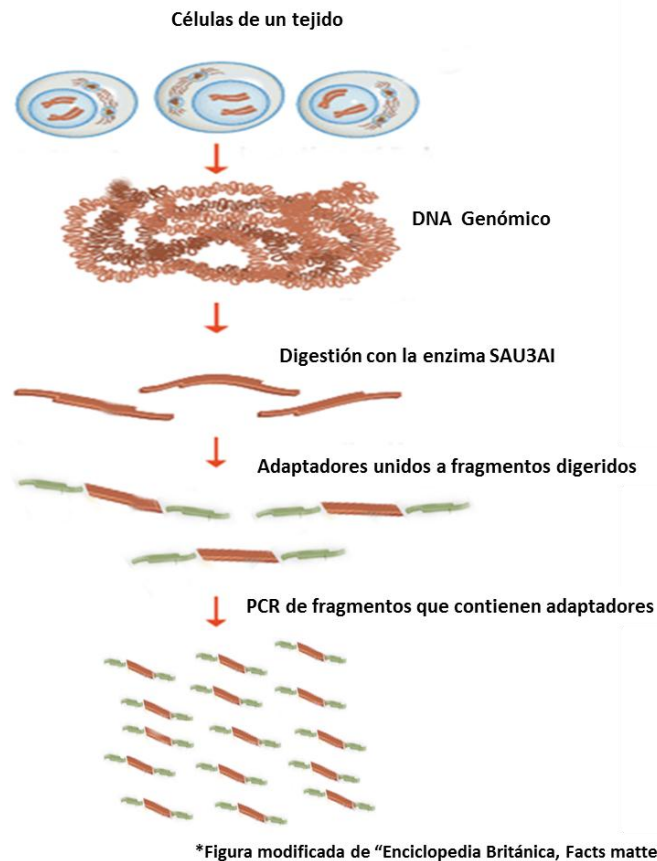
**Figura 5.** Representación esquemática de la detección de insertos pequeños para aislar microsatélites.

#### **II.6.4.3. A partir de librerías genómicas enriquecidas:**

A continuación se menciona el protocolo que se utilizó en el presente trabajo, el cual presenta modificación con respecto al original planteado en 1995 por Fleischer y colaboradores.

##### **i. Construcción de librerías genómicas**

Para la generación de una librería genómica es necesario realizar la ligación de un adaptador conocido a los fragmentos generados luego de la digestión del DNA genómico de un solo ejemplar (que representa el genoma de la especie) con una o más enzimas de restricción. El adaptador permite amplificar estos fragmentos utilizando como cebador el oligonucleótido que forma parte del adaptador (**Figura 6**).



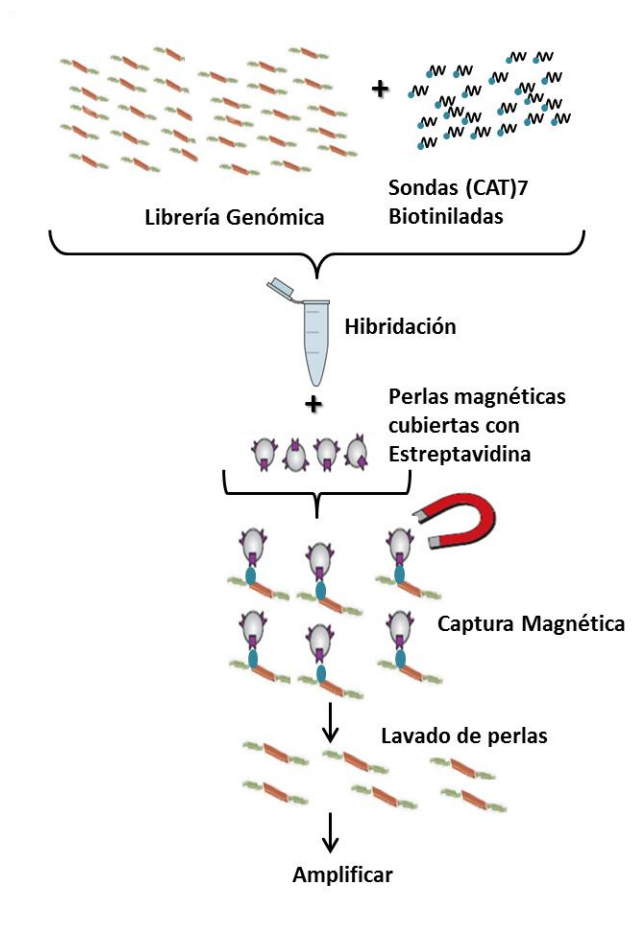
**Figura 6.** Generación de una librería genómica:

Una librería genómica es generada a partir de la amplificación de fragmentos de DNA unidos al adaptador. Una hebra del adaptador, es utilizada como cebador, facilitando la amplificación de los fragmentos de DNA.

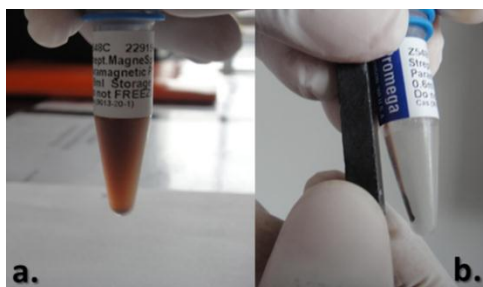
## ii. Enriquecimiento de librería genómica:

Este paso consiste en seleccionar, a partir de la librería genómica, aquellos fragmentos que contengan los microsatélites que se desea aislar (**Figura 7**). La estreptavidina es una proteína tetrámera de origen bacteriano con una alta afinidad por una vitamina llamada biotina (constante de disociación  $K_d=10^{-14}M$ ) (Holmberg *et al.*, 2005), esta propiedad es utilizada para poder realizar capturas de secuencias específicas de DNA como son los microsatélites. Para esto, se emplean sondas 5'-biotiniladas con motivo microsatélite y esferas magnéticas cubiertas de estreptavidina.

El proceso consiste en una hibridación entre la sonda biotinilada y los fragmentos digeridos del DNA seguido de otra hibridación entre la biotina de la sonda y la estreptavidina de las esferas magnéticas, finalmente se captura los fragmentos de DNA específicos con ayuda de un imán (**Figura 8**).



**Figura 7.** Diagrama del enriquecimiento de la librería genómica con una sonda microsatélite biotinilada (CAT)<sub>7</sub>.



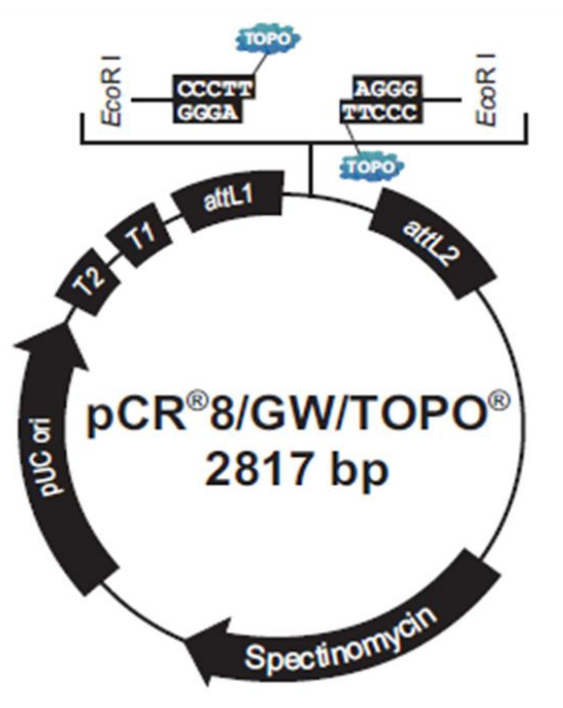
**Figura 8.** Captura de esferas magnéticas:

Se coloca el imán junto al tubo con las esferas magnéticas (**a**) de manera que éstas puedan ser capturadas (**b**).



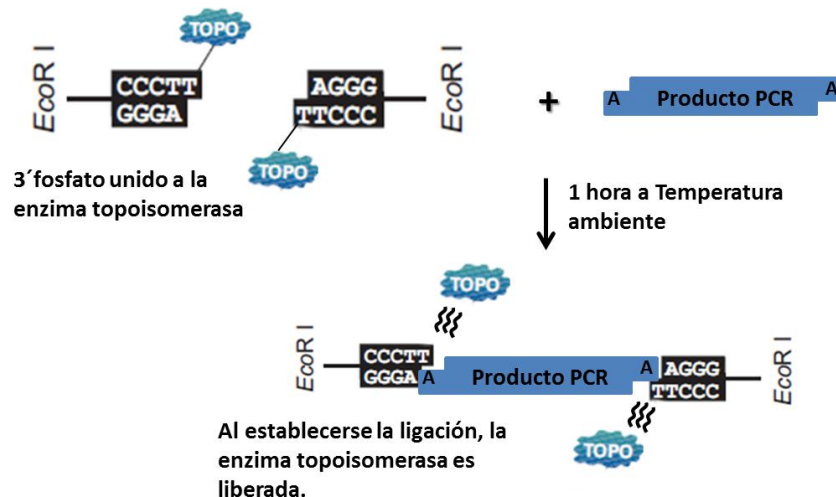
### iii. Ligación de insertos a un vector:

Se utilizó el kit de clonación pCR®8/GW/TOPO®TA que facilita un clonamiento de productos de PCR a vectores con una eficiencia mayor al 95% en un máximo de 1 hora. El vector pCR®8/GW/TOPO® (Figura 9) activado se encuentra linealizado con un extremo 3' timina libre y además la enzima topoisomerasa I se encuentra unida covalentemente en este extremo. Por otra parte, la enzima taq polimerasa posee una actividad transferasa terminal no dependiente de la cadena molde y adiciona por defecto una desoxi-adenosina al extremo 3' de los productos de PCR, favoreciendo la ligación de estos productos al vector (Figura 10). El enlace fosfotirosil formado entre el DNA y la topoisomerasa puede ser atacado por el 5' hidroxil, liberando a la topoisomerasa.



**Figura 9.** Vector pCR®8/GW/TOPO®:

Se puede observar que el vector posee el gen de resistencia al antibiótico Espectinomicina y el sitio de restricción para la enzima *Eco* RI.



**Figura 10.** Ligación de los producto de PCR al vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> activado por la enzima Topoisomerasa I.

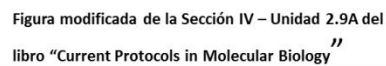
#### iv. Transformación bacteriana:

La transformación bacteriana puede llevarse a cabo de manera química o física utilizando células quimiocompetentes o electrocompetentes. En el presente trabajo se utilizó el método de electroporación para transformar las células One Shot<sup>®</sup>TOP10 electrocompetent *E. coli* (Invitrogen). Este método consiste en abrir poros en las paredes de células bacterianas mediante pulso eléctrico por el lapso de unos segundos, en los cuales, compuestos extracelulares como los vectores circularizados, ingresan a las células.

#### v. Selección de colonias positivas:

Para la selección de aquellas colonias con la secuencia de interés o colonias positivas, se utiliza el método Southern Blot y el Kit de detección colorimétrica de la biotina (Biotin Chromogenic Detection Kit – Fermentas).

El método Sourthen Blot permite la transferencia de bandas de DNA presentes en un gel de agarosa a una membrana de nylon cargada positivamente (**Figura 11**) para la detección de aquellas bandas que contengan la secuencia de interés.



Se muestra el sistema para la transferencia de las bandas de DNA presentes en un gel de agarosa a una membrana de nylon cargada positivamente.

Diagrama de un ensayo de inmunoprecipitación (co-IP) para verificar la interacción entre la enzima fosfatasa alcalina (AP) y la proteína de fusión CAT7.

El diagrama muestra la siguiente estructura de capas:

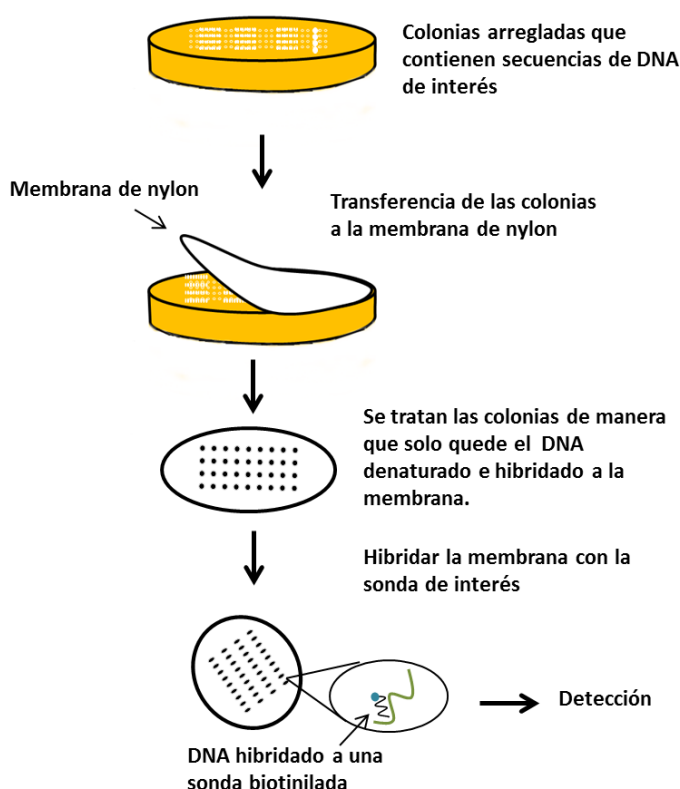
- Sustrato (BCIP/NBT):** Se encuentra en la parte superior, reaccionando con la enzima AP para formar un precipitado de color azul.
- Enzima Fosfatasa Alcalina (AP):** Representada por una esfera roja con la etiqueta "AP".
- Estreptavidina:** Representada por una línea vertical negra que conecta la AP con la biotina.
- Biotina:** Representada por una esfera amarilla que conecta la estreptavidina con la sonda.
- Sonda (CAT)7:** Representada por una línea horizontal amarilla que conecta la biotina con el DNA del vector.
- DNA del vector con la secuencia (CAT)7:** Representado por una línea horizontal verde que conecta la sonda con la membrana.
- Membrana:** Representada por una línea horizontal azul que forma la base del sistema.

17

**Figura 12.** Detección colorimétrica de colonias positivas.

Se utilizan dos tipos de selecciones:

**a. Primera selección:** Este procedimiento tiene como primer paso la transferencia de las colonias a una membrana de nylon directamente desde la placa petri. Luego las colonias son sometidas a lisis de manera que se obtenga el DNA genómico expuesto y denaturado para su posterior hibridación con una sonda biotinilada de interés (**Figura 13**). Finalmente, se utiliza el kit de detección colorimétrica de la biotina para la selección de colonias positivas.

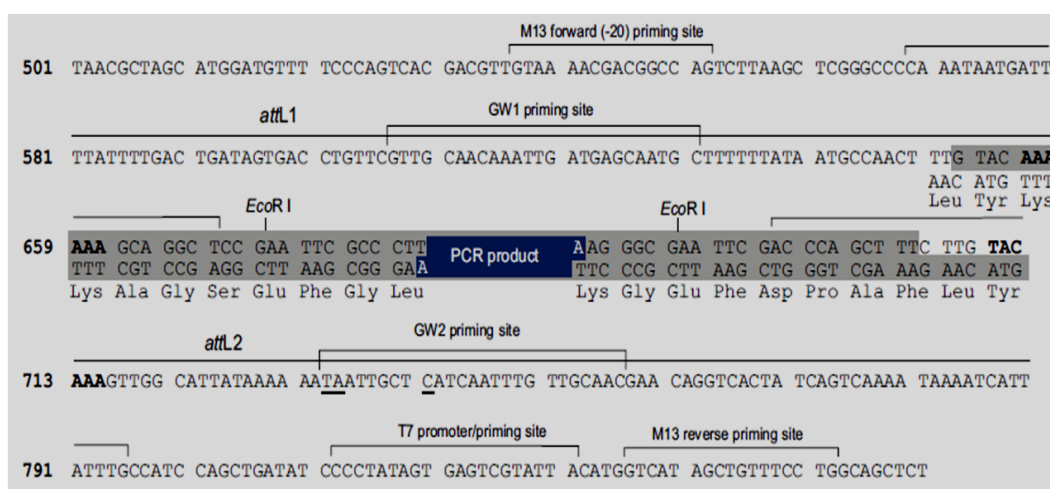


**Figura 13.** Primera selección:

Las colonias son transferidas a la membrana de nylon para su posterior lisis. El DNA denaturado que se obtiene puede ser hibridado con una sonda de interés (por ejemplo una sonda biotinilada). Finalmente se realiza la detección.

**b. Segunda Selección:** Se utiliza el método de Southern Blot. El vector pCR®8/GW/TOPO® posee dos sitios de restricción para la enzima *Eco* RI. Al

digerir el DNA del vector con esta enzima se puede obtener el inserto que contiene la secuencia de interés (**Figura 14**). Luego de la transferencia de bandas a la membrana de nylon, ésta es hibridada con la sonda biotinilada de interés que permite utilizar posteriormente el kit de detección colorimétrica de la biotina para la nueva selección de colonias positivas.



**Figura 14.** Secuencia del vector pCR®8/GW/TOPO®:

Se puede observar los sitios de restricción de la enzima *Eco*RI. Al digerir el vector con esta enzima se puede obtener nuevamente el inserto inicialmente ligado.

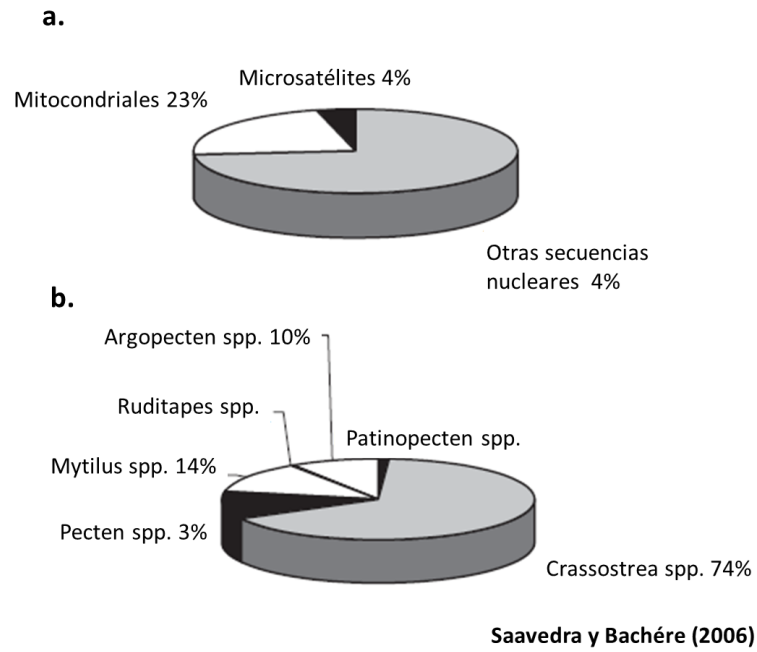
#### II.6.5. Trabajos en concha de abanico utilizando microsatélites:

Los registros de marcadores microsatélites para moluscos bivalvos aún son bajos en comparación con otras secuencias como las mitocondriales. Además, para el género *Argopecten* solo se dispone de un 10% del total de secuencias registradas para bivalvos en la base de datos “genbank” de NCBI (Saavedra y Bachére, 2006) (**Figura 15**).

Existen 29 registros de microsatélites polimórficos aislados a partir de concha de abanico (Pickerell *et al.*, 2004; Haye *et al.*, 2012; Mandiola *et al.*, 2012 y Marin *et al.*, 2012).

Wang *et al.*, 2009 utilizando microsatélites para el análisis de parentesco, encuentran híbridos de *Argopecten purpuratus* de Perú y *Argopecten irradians* en China. Marin *et al.*, 2012 al analizar la estructura genética de la concha de abanico peruana a partir de

genes nucleares (microsatélites) y mitocondriales (región parcial de 16S rRNA) en poblaciones de las Bahías de Sechura, Samanco e Independencia, recomiendan aumentar el número de muestras y de marcadores microsatélites a fin de obtener resultados más significativos.



**Figura 15.** Porcentajes de secuencias disponibles del genoma de bivalvos:

(a) El registro de microsatélites de bivalvos disponibles en la base de datos “genbank” es bajo en comparación con otro tipo de secuencias, además, (b) el registro de secuencias en general para el género *Argopecten* también es bajo.

### **III. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General:**

- Detectar microsatélites trinucleótidos “CAT” del genoma de concha abanico utilizando librerías genómicas enriquecidas.

#### **Objetivos Específicos:**

- Estandarizar un protocolo para obtener DNA genómico de alta calidad a partir de concha de abanico.
- Generar una librería genómica enriquecida con motivos microsatélites “CAT” a partir del genoma de concha de abanico.
- Obtener una batería de DNA de colonias positivas para motivos microsatélites “CAT”.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV.1. Lugar de Ejecución:**

La investigación se llevó a cabo en dos entidades: En el Laboratorio de Artes y Métodos de Pesca de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LAB AMP – UNMSM) y en el Centro de Genética y Biología Molecular de la Universidad San Martín de Porres (CGBM – USMP).

En el LAB AMP – UNMSM se llevó a cabo la extracción comparativa de DNA genómico, mientras que en el CGBM – USMP se realizó la detección de microsatélites con el motivo “CAT”.

### **IV.2. Extracción de DNA Genómico:**

Para poder obtener los microsatélites se necesita una buena cantidad de DNA de alta calidad. El material biológico se obtuvo en el terminal de Ventanilla (Callao). Se comparó la extracción DNA genómico de una sola muestra de concha de abanico utilizando tres tipos de tejido: músculo, gónadas masculina y femenina y dos tipos de buffer para su lisado: TNES-urea y N-Lauril sarcosil, ambos más proteinasa K (20 mg/mL). Se utilizó el protocolo modificado de precipitación con sales que fue propuesto por Miller *et al.*, 1988. El protocolo usado será descrito con más detalle a continuación:

#### **IV.2.1. Separación de tejidos:**

En la muestra se localizó el músculo, gónada masculina y gónada femenina (**Figura 16**). A continuación se realizó el corte separando un tejido del otro.



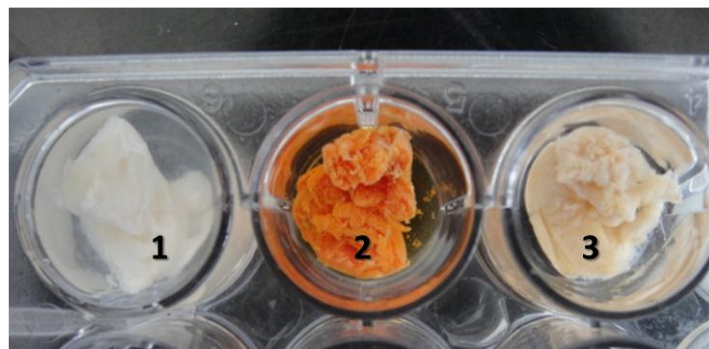


**Figura 16.** Ubicación de los tejidos de la Concha de Abanico:

(1) Músculo, (2) Gónada femenina y (3) Gónada masculina.

#### **IV.2.2. Lavado de muestra:**

Para eliminar posibles contaminantes, se lavó por separado cada tejido entre 3 a 4 veces con agua destilada y de 3 a 4 veces con buffer TE 10:1 (**Figura 17**) Finalmente secamos los tejidos y los colocamos por separado a tubos de 15mL.



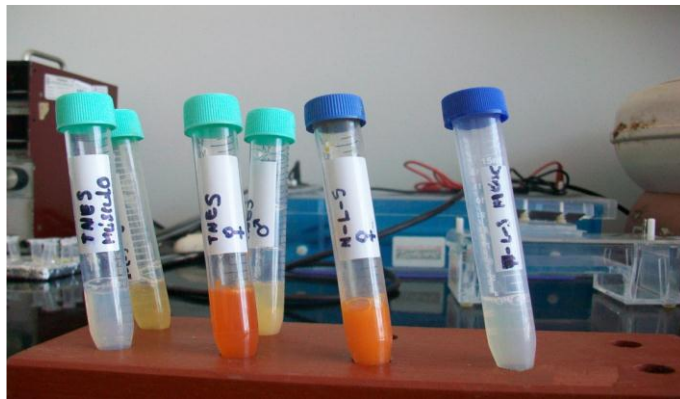
**Figura 17.** Lavado de tejidos por separado:

(1) Músculo, (2) Gónada femenina y (3) Gónada masculina.

#### **IV.2.3. Lisis de membranas:**

El objetivo de este paso fue liberar los ácidos nucleicos (principalmente DNA) al medio acuoso con ayuda de dos tipos de buffer de lisis por separado y para cada tejido (**Figura 18**). Para ello, se utilizó el siguiente protocolo:

- a. Se agregó a cada tubo: 3mL de buffer de lisis TNES-urea (Asahida *et al.*, 1996) más 10ul de proteinasa K (20mg/mL) y EDTA 15mM. Finalmente, los tubos se incuban a 55°C por 12 horas.
- b. Se agregó a cada tubo: 400 ul de N-Lauryl Sarcosyl (Sigma) y se enraza hasta 4mL con TE 20:5 más 10ul de proteinasa K (20mg/mL) y EDTA 15mM. Finalmente, los tubos se incuban a 55°C por 12 horas.



**Figura 18.** Lisis de tres tipos tejidos y con dos tipos de buffer.

La composición de cada solución se encuentra detallada en el Anexo I.

#### **IV.2.4. Precipitación y purificación de Ácidos Nucleicos:**

Las sales como el acetato de amonio y/o cloruro de sodio con ayuda de etanol absoluto frío en solución precipitan el DNA de manera diferencial con respecto a las proteínas y RNA presentes en el medio. Para cada tubo se realizó el protocolo siguiente:

- Se agregó acetato de amonio hasta una concentración final de 2.5 M y se mezcló por inversión.
- Se agregó de 2 1/2 a 3 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se incubó el tubo a -20 °C por 12 horas.
- Se centrifugó el tubo a 3000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se disolvió el pellet en 1 mL de TE 20:5.

- Se agregó cloruro de sodio hasta una concentración final de 0.25 M.
- Se agregó de 2 1/2 a 3 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se incubó el tubo a -20 °C por 12 horas.
- Se centrifugó el tubo a 3000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se lavó el pellet con 4 mL de alcohol al 70% (70% de etanol absoluto frío y 30% de TE 20:5).
- Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet en 1 mL de TE 20:1

Se realizó una corrida electroforética de cada DNA obtenido en un gel de agarosa 1.5% a 100 voltios por 45 minutos. Finalmente, se visualizó el gel en un transiluminador UVP.

### IV.3. Construcción de Librerías genómicas:

#### IV.3.1. Digestión y desfosforilación del DNA genómico:

El DNA genómico fue digerido con la enzima *Sau* 3AI (Fermentas) y desfosforilado con la enzima termo - sensible alcalina-fosfatasa FastAP<sup>TM</sup> (Fermentas). El protocolo se muestra a continuación:

Reactivos	Digestión	Desfosforilación
DNA genómico	20 ul	20 ul
Enzima <i>Sau</i> 3AI	3 ul	3 ul
Buffer Enzima <i>Sau</i> 3AI	10 ul	10 ul
Agua libre de nucleasas	67 ul	67 ul
Se incubó a 37°C por 30 minutos		
Enzima FastAP <sup>TM</sup>	-	5 ul
Buffer de la enzima FastAP <sup>TM</sup>	-	7 ul
Enzima <i>Sau</i> 3AI	.	2 ul
Volumen Final	100 ul	114 ul

- Las reacciones se mezclaron bien y se incubaron a 37°C por 5 horas.

Para eliminar las enzimas utilizadas y obtener el DNA en las condiciones requeridas, este fue precipitado:

- Se agregó acetato de amonio a una concentración final de 2.5M
- Se añadió 3 volúmenes de etanol absoluto frío se incubó a -20 °C por 30 minutos como mínimo.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se eliminó completamente el alcohol sobrenadante colocando el tubo de manera invertida, teniendo cuidado de no eliminar el pellet
- Se lavó el pellet con 300 ul de alcohol al 70% (70% de etano absoluto frío y 30% de agua destilada).
- Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se eliminó completamente el alcohol sobrenadante colocando el tubo de manera invertida, teniendo cuidado de no eliminar el pellet
- Se disolvió el pellet en 40 ul en agua libre de nucleasas.

#### IV.3.2. Ligación del DNA genómico al adaptador:

Se realizó las pruebas de ligación utilizando las enzima ligasa T4 (Fermentas) y FastAP™ (Fermentas).

La enzima ligasa T4 se preparó utilizando 2 ul de la enzima en 28ul de buffer 10X de enzima ligasa T4.

La secuencia de los oligonucleótidos que forman el adaptador son:

Oligonucleótido	Secuencia
SaulA	5'GCGGTACCCGGAAGCTTGG3'
SaulB - Fosforilado	5`/5Phos/ GATCCCAAGCTTCCCGGTACCGC3'

Para preparar el adaptador, se mezcló 6 ul de SaulA (100 pmol) y 6 ul de SaulB-fosforilado (100 pmol) y se enrazó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 200 ul.

El protocolo de las pruebas de ligación se muestra a continuación:

REACTIVOS	PRUEBA 1	PRUEBA 2	PRUEBA 3	
			M1	M2
ADN digerido	10 ul	-	-	-
ADN digerido y desfosforilado	-	8 ul	8 ul	8 ul
Buffer 10X de Ligasa T4	1.5 ul	2 ul	2 ul	2.2 ul
Agua libre de nucleasas	1.5 ul	8 ul	3ul	-
Adaptador	-	-	5 ul	10 ul

- Se incubó a 65°C por 10 minutos.
- Se incubó a 12°C por dos minutos. Durante este periodo agregar 2 ul de la enzima ligasa T4.
- Se incubó a 16°C por 12 horas.

#### IV.3.3. Librería genómica (PCR<sub>0</sub>):

Se amplificó mediante PCR los fragmentos ligados con el adaptador. La composición de la reacción fue la siguiente:

Soluciones en Stock	Volumen (ul)	Concentración Final
Agua libre de nucleasas	26.7	-
Buffer PCR 10X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	5	2.5 mM
dNTPs 10mM	5	1 mM
Cebador SaulA 10pM	5	1 pM
<i>Taq</i> polimerasa casera 5U/ul	0.3	-
DNA capturado	3	-
Volumen Final	50	

El programa de PCR fue el siguiente: una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por dos minutos, finalmente una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Se realizó una corrida electroforética del producto de la reacción en un gel de agarosa 1.5 % a 100 voltios por 45 minutos. Finalmente, se visualizó el gel en un transiluminador UVP.

#### **IV.4. Enriquecimiento de Librerías genómicas:**

##### **IV.4.1. Hibridación de sonda biotinilada con fragmentos de DNA:**

Para el presente trabajo se utilizó una sonda biotinilada con motivo (CAT)<sub>7</sub>. La temperatura de hibridación fue 5°C menos que la temperatura melting de la sonda.

Sonda	T° Melting	T° Hibridación
(CAT) <sub>7</sub>	51°C	46°C

El protocolo se indica a continuación:

- En un tubo de 200 ul se colocó 178 ul de buffer Church, 20 ul de PCR<sub>0</sub> (librería genómica) y 2 ul de sonda biotinilada. Se incubó la reacción a 95°C por 10 minutos y 46°C por 12 horas.

##### **IV.4.2. Hibridación de la sonda biotinilada y fragmentos de DNA con esferas magnéticas:**

Las esferas magnéticas se encuentran recubiertas con moléculas de estreptavidina. Un tubo de 600 ul con esferas magnéticas (Promega) posee de 100 ug de esferas magnéticas/ul. Para poder utilizarlas en el trabajo, requieren de un previo lavado. El protocolo se menciona a continuación:

- Se colocó un imán cerca del tubo con esferas magnéticas por 3 o 5 minutos, capturando todas las esferas magnéticas a un costado del tubo y junto al imán.
- Se extrajo el líquido sin crear turbulencias, evitando succionar las esferas magnéticas.
- Se agregó 500 ul de buffer B&W, se cerró el tubo y se agitó de manera que mezclamos la solución por 5 minutos.

**Nota:** Repetir estos pasos tres veces, suspendiendo las esferas magnéticas en 600 ul de buffer B&W como paso final.

Se utilizó 100 ul de esferas magnéticas lavadas y se mezclaron con los 200 ul de la reacción de hibridación. Finalmente, se incubó en movimiento a 43°C por 12 horas.

#### **IV.4.3. Captura y amplificación de fragmentos de DNA con motivo microsatélite:**

Los fragmentos fueron capturados recuperando las esferas magnéticas, estos fragmentos sirvieron como insertos que fueron ligados a vectores.

Se utilizó el siguiente protocolo:

- Las esferas magnéticas fueron recuperadas colocando un imán a un lado del tubo por 5 minutos y eliminando el buffer sobrenadante.
- Se agregó 400 ul de buffer SSC 1X con 0.1% de SDS, se mezcló suavemente y se mantuvo las esferas magnéticas en suspensión por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se recuperaron las esferas magnéticas.
- A 35.5°C (media entre la temperatura ambiente y la temperatura hibridación) se agregó 400 ul de buffer SSC 1X con 0.1% de SDS y se mantuvieron las esferas magnéticas en suspensión por 15 minutos. Se repitió este paso dos veces. Finalmente las esferas magnéticas fueron recuperadas.
- A la temperatura de hibridación, se agregó 400ul de buffer SSC 1X con 0.1% de SDS y se mantuvieron las esferas magnéticas en suspensión por 15 minutos. Se repitió este paso dos veces. Finalmente las esferas magnéticas fueron recuperadas.
- Se agregó 500 ul de buffer SSC 1X y se mantuvieron las esferas magnéticas en suspensión a temperatura ambiente por 2 minutos. Finalmente las esferas magnéticas fueron recuperadas.
- Se agregó 50 ul de TE 10:1 y se mantuvieron las esferas magnéticas en suspensión por 2 minutos.
- Se incubó a 95°C por 10 minutos, de manera que liberamos los fragmentos de DNA con secuencias microsatélite "CAT" de la sonda biotinilada y las esferas magnéticas.
- Se colocó el imán a un lado del tubo y se recuperó el sobrenadante.

- Se realizó la amplificación de los fragmentos capturados utilizando tres condiciones para el número de ciclos: 25, 30 y 35. La reacción de PCR se preparó de la siguiente manera:

Soluciones en stock	Volumen (ul)	Concentración Final
Agua libre de nucleasas	19.8	-
Buffer PCR 10X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> 25mM	5	2.5mM
dNTPs 10mM	5	1mM
Primer SaulA 10pM	5	1pM
Taq platinum 5U/ul	0.2	-
DNA capturado	10	-
Volumen Final	50	

El programa de PCR fue el siguiente: una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 25, 30 o 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por dos minutos, finalmente una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Se realizó una corrida electroforética del producto de la reacción en un gel de agarosa 1.5 % a 100 voltios por 45 minutos. Finalmente, se visualizó el gel en un transiluminador UVP.

La composición de cada solución se detalla en el Anexo I.

#### **IV.5. Ligación de insertos con vectores pCR®8/GW/TOPO®:**

El protocolo se menciona a continuación:

- Se diluyó 9 ul del producto de PCR que posea el mayor barrido posible (más diverso) con 18 ul de agua libre de nucleasas.
- Se formó la cola poliA en el producto de PCR diluido, agregándole 0.5 ul de Taq platinum (Invitrogen). Se incubó a 72°C por 30 minutos.
- Se realizó la ligación de la siguiente manera:



Reactivos	Volumen
Producto PCR diluido	3ul
Solución salina (Kit)	1ul
Agua (Kit)	1.5ul
Vector TOPO®	0.5ul
Volumen Final	6ul

- Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 1 hora.

#### **IV.6. Transformación de células *E. coli* electrocompetentes con el vector pCR®8/GW/TOPO® y arreglo de colonias:**

El protocolo para la transformación bacteriana se detalla a continuación:

- En un tubo de 1.5 mL se mezcló 50 ul de agua libre de nucleasas, 50 ul de células electrocompetentes One Shot® TOP 10 (INVITROGEN) y 2.5 ul de la reacción de ligación.
- Se agregó la mezcla a una cubeta de electroporación estéril de 1mm (BTX) y se realizó la electroporación a 2000 voltios por breves segundos.
- Se agregó 250 ul de medio SOC a la cubeta de electroporación y se transfirió su contenido a un tubo de 1.5 mL. Se incubó a 37°C por 1 hora a 200 rpm.
- Se sembró 200 ul de las células en una placa petri de 150x20 mm con medio Luria - Bertani (LB) sólido más 6 ul de espectinomicina 100 mg/mL. Se incubó a 37°C por 12 horas.
- Se guardó la placa petri a 4°C.

Empleando puntas de 10 ul estériles se extrajeron al azar las bacterias transformadas y fueron colocadas en otra placa petri cuya parte posterior poseía cuadrículas como guía. Se incubó la placa a 37°C por 12 horas y finalmente fue guardada a 4°C.

La composición de medios se detallada en el Anexo II.

#### IV.7. Selección de colonias positivas:

Para la detección de colonias que poseen la secuencia microsatélite “CAT” se realizaron dos tipos de selecciones. Para esto, una vez hibridada la sonda biotinilada a la membrana de nylon, se utilizó el kit de detección colorimétrica de la biotina.

##### IV.7.1. Detección colorimétrica de la biotina:

Los volúmenes y soluciones que se utilizaron por cada membrana son los siguientes:

Solución	Volumen
Buffer de bloqueo/lavado	200 mL
Solución de bloqueo	50 mL
Conjugado AP -estreptavidina diluido	20 mL
Buffer de detección	30 mL
Solución sustrato	10 mL

**Buffer de bloqueo/lavado:** Se llevó la solución stock 10X a 1X con agua bidestilada.

**Solución de bloqueo:** Se diluyo 1g del reactivo de bloqueo por cada 100mL. La dilución se facilitó entre 50 o 60°C.

**Conjugado AP-estreptavidina diluido:** Se diluyó 1 ul del conjugado AP - estreptavidina por cada 5 mL. **Nota:** Esta solución se debe preparar solamente al momento de ser requerida.

**Buffer de detección:** Se llevó la solución stock 10X a 1X con agua bidestilada.

**Solución sustrato:** Se llevó la solución stock 50X a 1X con agua bidestilada. **Nota:** Esta solución se debe preparar solamente al momento de ser requerida.

Utilizando una bandeja como soporte para la membrana de nylon, se realizó la detección colorimetría de biotina. El protocolo se detalla a continuación:

- Se agregó 30 mL del buffer de bloqueo/lavado a temperatura ambiente por 5 minutos y con agitación moderada.
- Se agregó 30mL de la solución de bloqueo a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación moderada.
- Se agregó 20mL del conjugado AP - estreptavidina diluido a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación moderada.

- Se lavó la membrana a temperatura ambiente y con agitación moderada de la siguiente manera:
  - a. Se agregó 60 mL de buffer de bloqueo/lavado por 15 minutos. Se repitió este paso dos veces.
  - b. Se agregó 20mL de buffer de detección por 10 minutos.
- Se agregó 10mL de solución sustrato a temperatura ambiente y se incubó en un ambiente oscuro. **Nota:** El precipitado de color azul se observó a los 30 minutos, sin embargo para obtener una mayor resolución se incubó la membrana por 12 horas.
- Una vez que se obtuvo el contraste requerido, se detuvo la reacción lavando la membrana con agua bidestilada.
- Se dejó secar la membrana a temperatura ambiente.

#### **IV.7.2. Primera selección:**

Se utilizaron dos membranas de nylon ultra puras con poros de 1.2  $\mu$ m (ROCHE) sin carga.

El protocolo para cada membrana de nylon se detalla a continuación:

##### **IV.7.2.1. Obtención de DNA genómico denaturado:**

- Se colocó cuidadosamente la membrana sobre la placa petri que contiene las colonias arregladas de manera que la cubrió en su totalidad y no se formaron burbujas. Con una aguja, se realizó tres perforaciones a la membrana de nylon y al medio de cultivo, ello sirvió de orientación para identificar la correcta posición de las colonias.
- Con las colonias orientadas hacia la parte exterior, se colocó la membrana por 15 minutos sobre papel Whatman 3 MM embebido con solución de denaturación.
- Se dejó secar la membrana a temperatura ambiente.
- Con las colonias orientadas hacia la parte exterior, se colocó la membrana por 15 minutos sobre papel Whatman 3MM embebido con solución de neutralización.
- Se dejó secar la membrana a temperatura ambiente.

- Con las colonias orientadas hacia la parte exterior, se colocó la membrana por 10 minutos sobre papel Whatman 3MM embebido con solución SSC 2X.
- Se dejó secar parcialmente la membrana a temperatura ambiente
- Se irradió la membrana con UV por 3 minutos con las colonias orientadas hacia la parte interna del transiluminador UVP.
- Se dejó secar la membrana completamente a temperatura ambiente.
- Se colocó la membrana dentro de una placa petri de 150x20mm como soporte y se agregó una solución de proteinasa K (20 mg/mL) diluida 1:10 con solución SSC 2X distribuyéndola uniformemente sobre la membrana.
- Se incubó a 37°C por 1 hora.
- Para remover los restos celulares (debris) se colocó papel Whatman 3MM embebido con agua bidestilada sobre la membrana, realizando una leve presión.

#### **IV.7.2.2. Hibridación de la sonda (CAT)<sub>7</sub> a la membrana:**

Este procedimiento consiste en hibridar la sonda biotinilada (CAT)<sub>7</sub> a la membrana obtenida en el paso anterior. El área de la membrana fue 138,6 cm<sup>2</sup>.

- Se pre-hibridó la membrana con buffer church (200 ul/cm<sup>2</sup>) a 65°C por 2 horas.
- Se hibridó la membrana con buffer church (75 ul/cm<sup>2</sup>) y 2ul de la sonda biotinilada (CAT)<sub>7</sub> a la temperatura de hibridación de la sonda (46°C) por 12 horas.
- Se lavó la membrana 6 veces con 30 mL de una solución astringente (SSC 2X, 0.1% SDS). **Nota:** Los lavados deben realizarse con agitación suave por 15 minutos cada uno.

Se continuó con la detección colorimétrica de la biotina.

#### **IV.7.3. Segunda Selección:**

El método utilizado en esta selección es la detección de la secuencia de interés a partir de la transferencia de bandas de un gel de agarosa a una membrana de nylon (Southern Blot). Una vez detectadas las colonias positivas en la primera selección, estas son elegidas para la segunda selección.

#### IV.7.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico de las colonias:

El protocolo se detalla a continuación:

- Se extrajo cada una de las colonias de la placa petri y fueron sembradas separadamente en tubos de 15mL con 6mL medio Luria – Bertani (LB) líquido más 6 ul de espectinomicina 100 mg/mL. Se incubaron las colonias a 37°C por 12 horas a 200 rpm.
- Se guardó un stock de colonias a -80°C. Para esto, se colocó 1 mL del medio Luria – Bertani (LB) líquido con colonias más 225ul de glicerol al 80%.
- Se formó un pellet de colonia, pasando sucesivamente 1mL de medio Luria – Bertani (LB) líquido con colonia a tubos de 1.5 mL y centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos. Se repitió este paso 5 veces más.
- Se agregó 100 ul de una mezcla de solución I y 4mg/mL de lisozima a cada pellet y se mezcló con ayuda de un vortex. **Nota:** mezclar la solución I con lisozima solamente al momento de ser requerida.
- Se agregó 150 ul de solución II, se mezcló con ayuda de un vortex y se incubó en hielo por 5 minutos. **Nota:** la solución II debe ser preparada al momento de ser requerida.
- Se agregó 100 ul de solución III, se mezcló con ayuda de un vortex y se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se centrifugo a 12500 rpm por 5 minutos. Se pudo observar dos fases, la primera es el sobrenadante en el cual se encuentra el DNA plasmídico y la segunda, donde se encuentran los restos bacterianos producto de la lisis.
- Se transfirió el sobrenadante a otro tubo.
- Se agregó 1 mL de etanol absoluto frío e incubó a -20°C por 12 horas.
- Se centrifugo a 12500 rpm por 15 minutos y se eliminó el etanol completamente colocando el tubo de manera invertida.
- Se disolvió el pellet con 300 ul de agua libre de nucleasas.

- Se agregó 6 ul de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por media hora.
- Se precipitó el DNA con acetato de amonio hasta una concentración final de 2.5 M y 1 mL de etanol absoluto frio. Luego se incubó esta mezcla a -20°C por 12 horas.
- Se lavó el pellet con 500 ul de 70% alcohol (70% de etanol absoluto frio y 30% de agua destilada).
- Se centrifugo a 12500 rpm por 5 minutos y se eliminó el etanol completamente colocando el tubo de manera invertida.
- Se resuspendió el pellet en 30 ul de agua libre de nucleasas.

La composición de medios se detallada en el Anexo II.

La composición de cada solución se encuentra detallada en el Anexo I.

#### IV.7.3.2. Digestión de DNA plasmídico:

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

Reacción	
DNA (200 ng/ul)	5
Buffer <i>Eco</i> RI	1
Enzima <i>Eco</i> RI (10U/ul)	0.5
Agua libre de nucleasas	3.5

- Se mezcló y se incubó la reacción a 37°C por 3 horas.

Se realizó una corrida electroforética del producto de la reacción en un gel de agarosa 1.5 % a 100 voltios por 45 minutos. Finalmente se visualizó el gel en un transiluminador UVP.

#### IV.7.3.3. Southern Blot:

Se utilizaron membranas de nylon ultra puro con poros de 1.2um (Roche) cargadas positivamente.

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

- Se enjuagó el gel con agua destilada.

- El gel fue colocado en una bandeja y enjuagado con 400 mL de buffer de transferencia alcalina.
- La membrana de nylon y dos papel Whatman 3MM fueron humedecidos con buffer de transferencia alcalina.
- Se armó el sistema Southern Blot (**Figura 11**) y se dejó que las bandas se transfieran a la membrana de nylon por 12 horas.
- Se retiró la membrana de nylon y visualizó el gel en un transiluminador UVP. **Nota:** La transferencia es efectiva si ya no se observan bandas en el de agarosa.
- Con ayuda de un lápiz se marcó el orden de los pocillos en la membrana.
- Se lavó la membrana con 50 mL buffer de neutralización
- Se humedeció la membrana con 50 mL de solución SSC 6X.
- Lavar la membrana con 30 mL de buffer church a 65°C por 1 hora.
- Se incubó la membrana de nylon con 10mL de buffer church y 2ul de la sonda biotinilada (CAT)<sub>7</sub> a la temperatura de hibridación de la sonda (46°C) por 12 horas.
- Se lavó la membrana con 50 mL de una solución SSC 2X y 0.1% SDS por 10 minutos. Este paso se repitió 6 veces.

Se procedió con la detección colorimétrica de la biotina.

La composición de cada solución se encuentra detallada en el Anexo I.

#### **IV.8. Obtención de DNA plasmídico para secuenciamiento:**

Se procedió a seleccionar aquellas colonias positivas obtenidas en la segunda selección. A partir de cada gel de agarosa se eligió aquellas colonias cuyos insertos difieran en tamaño (pares de bases).

Para poder obtener un buen secuenciamiento del inserto, primero se debe aislar el DNA plasmídico utilizando un protocolo que permita una mayor purificación.

El protocolo se detalla a continuación:

- A partir del stock se cultivaron las colonias seleccionadas en 5 mL de medio Luria – Bertani (LB) líquido y se incubaron a 37°C por 12 horas.

- Se formó un pellet de cada colonia, pasando sucesivamente 1mL de medio líquido con colonia a tubos de 1.5 mL y centrifugando a 12500 rpm por 2 minutos. Se repitió dicho este paso 5 veces más.
- Se agregó 200 ul de buffer GET a cada pellet se mezcló por inversión.
- Se agregó 300 ul de solución fresca de NaOH 0.2N y SDS 1% a cada pellet y mezclar. Incubar en hielo por 5 minutos.
- La solución fue neutralizada agregando 300 ul de acetato de potasio 3 M pH 4.8. Se mezcló y se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se centrifugo a 12500 rpm por 15 minutos. Aquí se pudo observar dos fases, una donde se encuentra el DNA y otra donde están los restos celulares.
- Se transfirió el sobrenadante a otro tubo.
- Se agregó 6 ul de RNAsa (10 mg/ul) y se incubar a 37°C por 30 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante dos veces utilizando cloroformo de la siguiente manera:
  - a. Se agregó 400 ul de cloroformo y se mezcló por inversión durante 30 segundos.
  - b. Se centrifugo a 12500 rpm por 1 minuto.
  - c. La fase superior fue transferida a un tubo nuevo.
- Se agregó un volumen igual al obtenido de isopropanol al 100 %, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 12 horas.
- Se centrifugo a 12500rpm por 10 minutos y luego se elimino completamente el isopropanol sobrenadante.
- Se lavó el pellet con 500 ul de alcohol al 70 % (70% de etanol absoluto frio y 30% de agua destilada).
- Se centrifugo a 12500 rpm por 4 minutos y luego se elimino completamente el alcohol sobrenadante.
- Se disolvió el pellet obtenido en 32 ul de agua libre de nucleasas.
- Se agregó 8 ul de NaCl 4 M y 40 ul de 13% PEG 8000. Se mezcló por inversión y luego se incubó en hielo por 20 minutos.

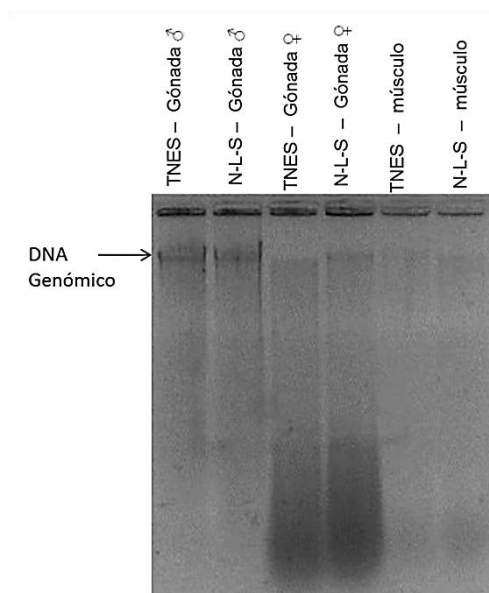


- Se centrifugo a 12500 rpm a 4°C por 15 minutos y luego se eliminó cuidadosamente el sobrenadante.
- Se lavó el pellet con 500 ul de alcohol 70%.
- Se centrifugo a 12500 rpm por 4 minutos y luego se eliminó completamente el alcohol sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet obtenido en 20 ul de agua libre de nucleasas.

## V. RESULTADOS

### V.1. Extracción de DNA genómico:

A partir de la gónada femenina se obtuvo DNA de baja calidad y además se pudo observar la presencia de RNA., Por el contrario, utilizando la gónada masculina, se pudo observar una elevada cantidad de DNA y además eliminar el RNA, incluso utilizando los dos buffer de lisis (**Figura 19**). La extracción a partir del tejido muscular no mostró DNA.



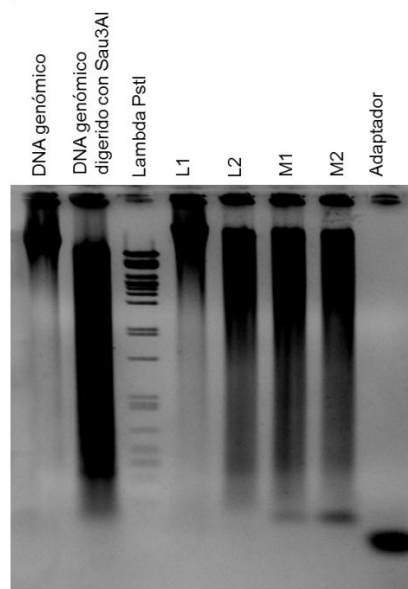
**Figura 19.** Extracción comparativa de DNA utilizando dos tipos diferentes de buffer de lisis.

### V.2. Generación de la librería genómica y enriquecimiento:

El DNA digerido con la enzima de restricción se pudo ligar completamente debido a que posee los grupos fosfato en ambos extremos (**Figura 20: L1**), sin embargo cuando el DNA digerido fue desfosforilado, los grupos fosfato de los extremos 5' y 3' fueron eliminados, por lo que la enzima ligasa T4 no pudo realizar la ligación (**Figura 20: L2**). Para que la reacción de ligación del adaptador a los fragmentos generados por digestión sea posible, es necesario desfosforilar los fragmentos para que no ocurra ligación entre ellos. En la **Figura 20: M1 y M2** se puede observar la correcta reacción de ligación de ambas concentraciones del adaptador con los fragmentos de DNA.

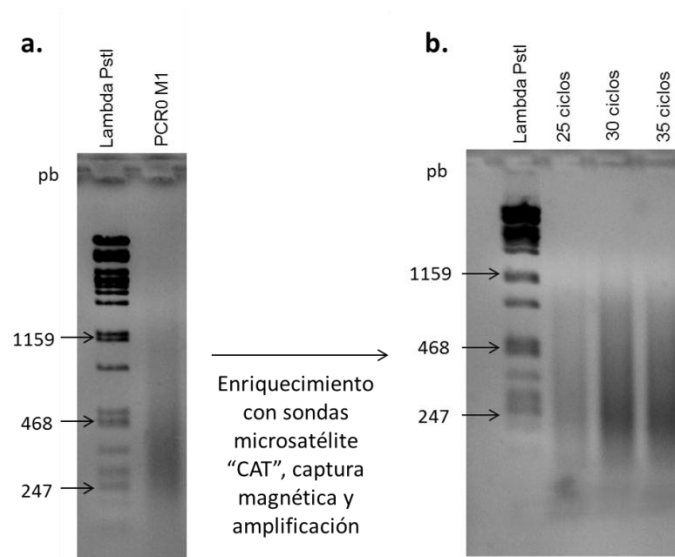
En la **Figura 21a** se observa la reacción de PCR para obtener la librería genómica utilizando una de las hebras del adaptador como cebador (SaulA), se logró amplificar fragmentos entre 247 y 1159 pares de bases aunque la reacción fue más favorable para aquellos fragmentos entre 247 y 468 pares de bases.

El amplificado de los fragmentos capturados luego del enriquecimiento a diferentes ciclos también mostró una tendencia favorable para fragmentos entre 247 y 468 pares de bases (**Figura 21b**).



**Figura 20.** Reacciones de digestión, desfosforilación y ligación al adaptador del DNA genómico:

L1: digestión del DNA con la enzima *Sau* 3AI más enzima ligasa T4, L2: digestión y desfosforilación del DNA más enzima ligasa T4, M1: ligación de fragmentos generados con el adaptador a una proporción 1:0.6 y M2: ligación de fragmentos generados con el adaptador a una proporción 1:1.2.

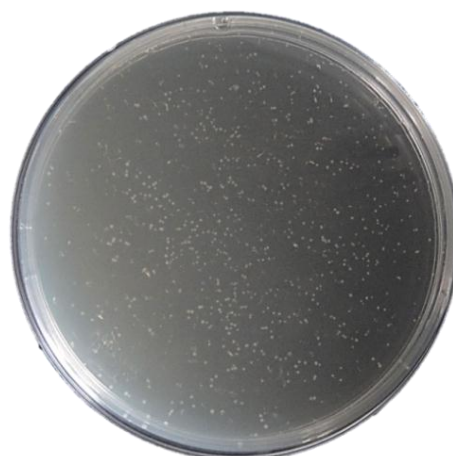


**Figura 21.** Librería genómica y enriquecimiento:

Una vez que se han ligado los fragmentos de DNA al adaptador, éstos fueron amplificados para obtener una librería genómica **(a)** a partir de la cual se realiza la captura de microsatélites con motivos "CAT". Este DNA capturado es amplificado a diferentes ciclos, de manera que, se pueda elegir el que tenga una mayor diversidad de fragmentos (observado como mayor barrido en el gel) **(b)**.

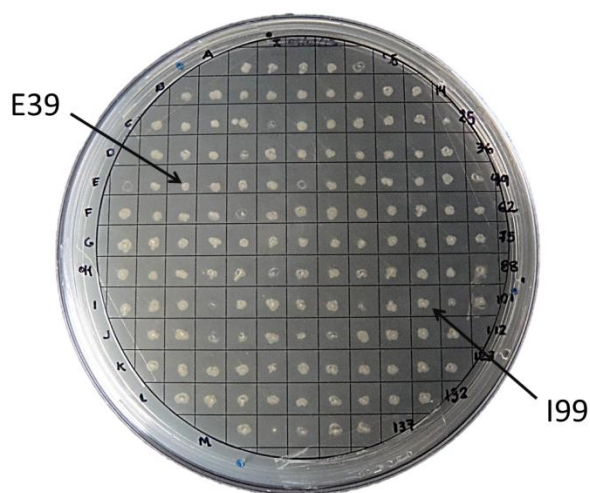
### V.3. Transformación de células electrocompetentes y arreglo de colonias:

Se eligió como insertos aquellos fragmentos generados con 35 ciclos en la amplificación de aquellos obtenidos a partir la librería genómica enriquecida. En la **Figura 22** se puede observar una elevada cantidad de colonias transformadas.



**Figura 22.** Células electrocompetentes transformadas.

Se arreglaron 137 colonias. Las colonias fueron nombradas por número y letra, de la "A" a la "M" y desde el "1" al "137".



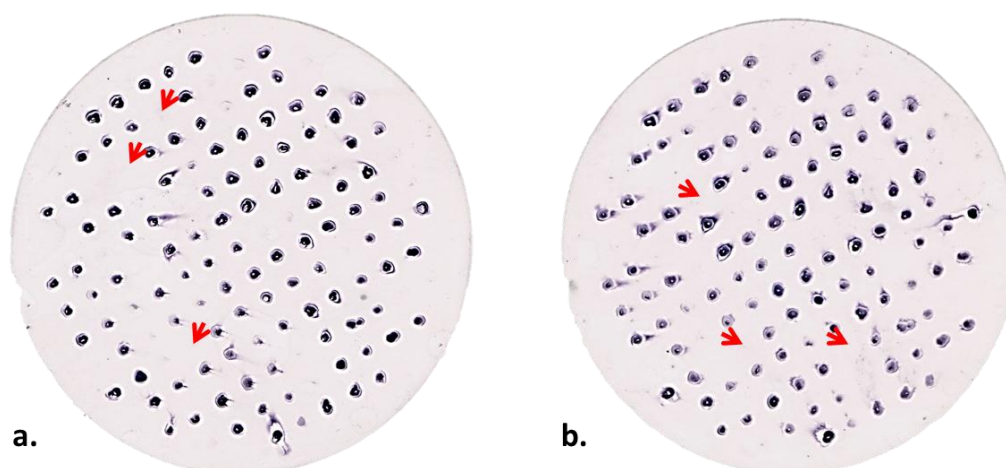
**Figura 23.** Arreglo de 137 colonias en una placa petri utilizando una cuadrícula como guía.

#### **V.4. Selección de colonias positivas:**

##### **V.4.1. Primera Selección:**

En la **Figura 24** se observa un solo patrón de manchas que se conserva en ambas membranas, por lo que es posible descartar posibles errores en la hibridación de la sonda biotinilada u otra parte del proceso.

En la **Tabla 1** se detalla la cantidad de colonias positivas y negativas que se detectó en la primera selección, lográndose obtener 81% de colonias positivas.



**Figura 24.** Primera selección de colonias positivas:

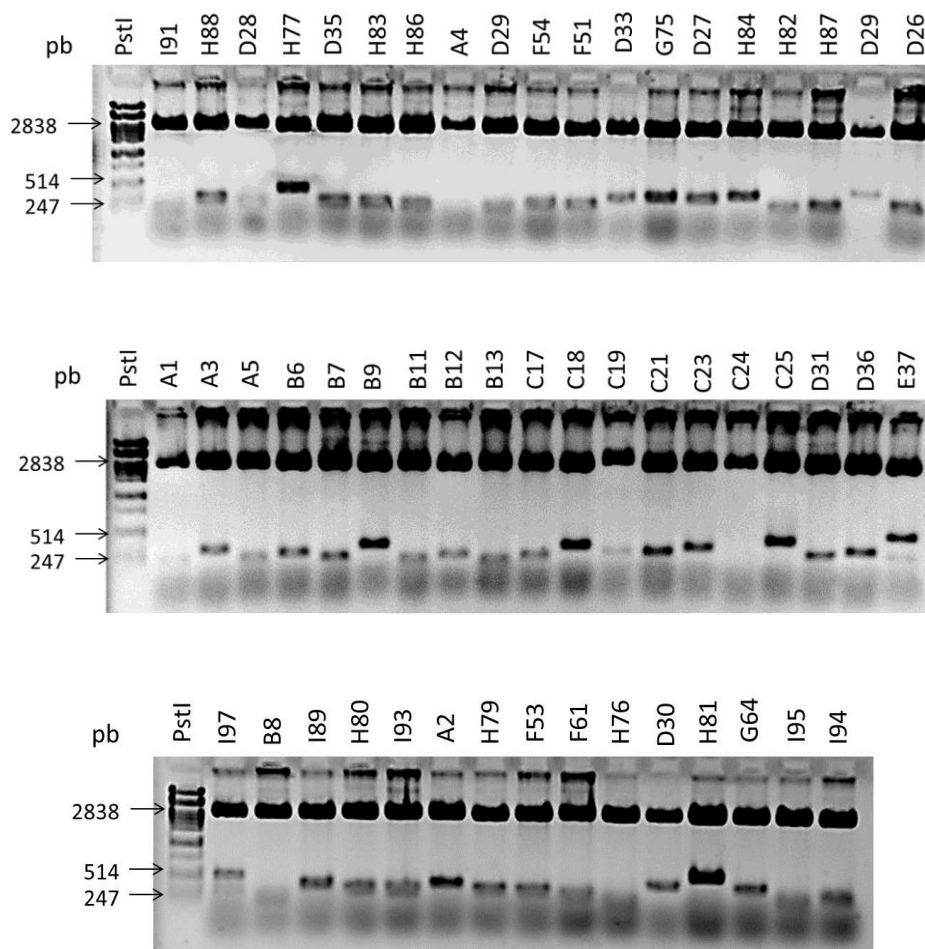
Se puede observar que para ambas membranas, el patrón se conserva. Las colonias positivas se muestran como manchas azules, mientras que las flechas muestran algunas colonias negativas.

PRIMERA SELECCIÓN	
colonias (+)	111
colonias (-)	26
colonias arregladas	137
% colonias positivas	81%

**Tabla 1.** Resultados del conteo de las colonias positivas y negativas a partir de la primera selección.

#### V.4.2. Segunda Selección:

El DNA plasmídico tiene un peso molecular establecido de 2817 pares de bases y se observó como un solo patrón en la parte superior del gel de agarosa, mientras que los insertos liberados son de menor peso molecular y algunos variaron en tamaño observándose bandas a distintos niveles en la parte inferior del gel (**Figura 25**).

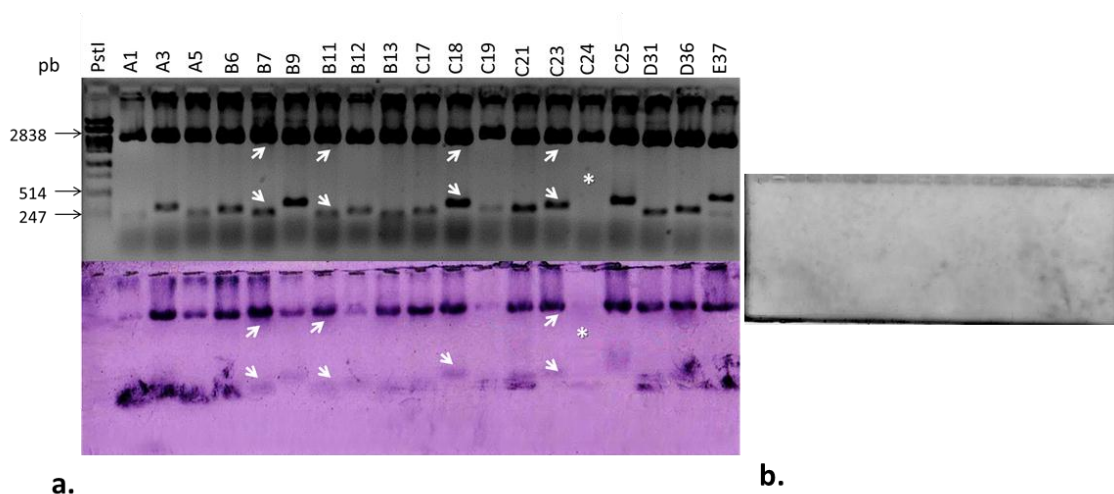


**Figura 25.** Geles de agarosa luego de liberar el inserto del DNA plasmídico:

Se aprovechó el sitio de restricción para la enzima *Eco* RI que posee el vector.

En la detección colorimétrica se pudo observar que el vector también fue teñido, esto se debe a que el DNA plasmídico que se obtuvo no fue digerido en su totalidad, se descarta una mala hibridación ya que existen colonias negativas como C24 cuyo vector no logró teñirse como se observa en la **Figura 26a** y además, la transferencia de las bandas se logró en su totalidad como se observa en la **Figura 26b**.

En la **Tabla 2** se detalla la cantidad de colonias positivas y negativas que se detectó en la segunda selección, lográndose obtener 80% de colonias positivas.



**Figura 26.** Segunda selección de colonias positivas:

Las flechas indican algunas colonias positivas y el asterisco indica una colonia negativa **(a)**. La no presencia de bandas en el gel de agarosa indica que se logró transferir la totalidad de ellas a la membrana de nylon **(b)**.

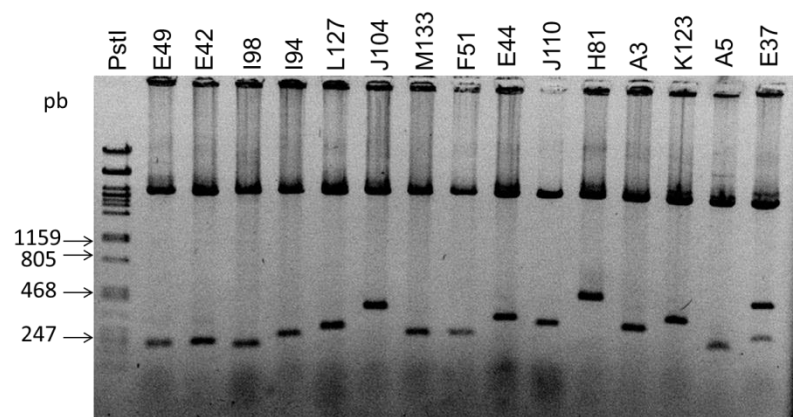
SEGUNDA SELECCIÓN	
colonias (+)	89
colonias (-)	14
total colonias en la segunda selección	111
% colonias positivas	80%

**Tabla 2.** Resultados del conteo de las colonias positivas y negativas a partir de la segunda selección.

En general, considerando el total de colonias arregladas, se pudo obtener un 65% de colonias positivas a partir del método de librerías genómicas enriquecidas.

### V.5. DNA plasmídico de colonias para secuenciamiento:

Para poder visualizar el aislamiento de DNA, las colonias fueron digeridas nuevamente con la enzima de restricción *Eco* RI. La **Figura 27** muestra la variación en tamaño de insertos de las colonias seleccionadas. El inserto de la colonia E37 posiblemente tenga un sitio de restricción para la enzima *Eco* RI; sin embargo, esto debe ser verificado mediante secuenciamiento.



**Figura 27.** DNA plasmídico de las colonias seleccionadas para secuenciamiento.



## VI. DISCUSIÓN

### VI.1. Extracción de DNA genómico:

Para que el aislamiento de microsatélites de una especie sea eficiente, el DNA que debemos aislar debe ser de alta calidad y cantidad (Glenn y Schable, 2005) además, debe tenerse en cuenta que mientras más fresco se encuentre el tejido de una muestra, se puede obtener un DNA de mejor calidad (Parenrengi, 2001). En el presente trabajo la muestra fue obtenida en el mercado de Ventanilla (Lima – Perú) y se procedió a realizar el aislamiento de DNA el mismo día. Glenn y Schable (2005) recomiendan protocolos de aislamiento de DNA por silica, aunque este método resulta ser un poco costoso. Sambrook *et al.*, 1989 recomienda el protocolo utilizando fenol-cloroformo y precipitación con etanol para distintos organismos; sin embargo, hay que recordar que el fenol es corrosivo y el cloroformo es cancerígeno. El protocolo a utilizar también dependerá mucho de la disponibilidad de materiales en el laboratorio, en el presente trabajo pudo obtenerse exitosamente DNA de alta cantidad y calidad utilizando como buffer de lisis TNES-urea seguido de precipitaciones con sales a partir de la gónada masculina como se puede ver en la **Figura 19**. Esto puede ser tomado en cuenta para estudios donde se requiera amplificar una región del genoma de la concha de abanico.

### VI.2. Generación de la librería genómica y enriquecimiento:

Uno de los pasos críticos para la obtención de la librería genómica y su enriquecimiento es la ligación de los fragmentos de DNA a un adaptador (Hamilton *et al.*, 1999) que permitirá recuperar los microsatélites de interés. Para poder realizar esto, se utilizó la enzima de restricción *Sau* 3AI que generó extremos GATC en el DNA complementario al extremo del adaptador *Sau*IA/*Sau*IB. Además, la enzima fosfatasa alcalina desfosforiló los extremos de los fragmentos de DNA evitando que se autoligue y así la reacción sea favorable solo con el adaptador (**Figura 20**). Sin embargo debido

al uso de una sola enzima, los insertos generados pueden no ser representativos de todo el genoma (Hamilton *et al.*, 1999).

Para el enriquecimiento, es importante considerar que la formación del complejo biotina - estreptavidina es directamente proporcional a la concentración de sales pero inversa a la temperatura, concentraciones de cloruro de sodio menores a 100mM ya provocan que más del 20% de complejos se rompan, lo mismo para temperaturas por encima de los 60°C (Holmberg *et al.*, 2005). Nunome *et al.*, 2006 señalan que el enriquecimiento es más sensible al número de lavados de las esferas magnéticas luego de la hibridación con respecto a los cambios de temperatura. Considerando esto, para la correcta captura de microsatélites con el motivo “CAT” se realizaron cuatro lavados con cloruro de sodio (en solución salina de citrato, SSC 1X) una concentración de 150 mM y la temperatura de los lavados e hibridación no superaron los 46°C,

Una vez capturados, los fragmentos de DNA con el motivo “CAT” fueron amplificados a diversos ciclos de PCR con el fin de obtener una mayor cantidad y así diversidad de fragmentos (visto como el mayor barrido en el gel de agarosa); sin embargo, en la **Figura 21b** puede observarse que no existió diferencia de amplificación entre los ciclos, siendo favorable para fragmentos de DNA entre 247 y 468 pares de bases del mismo modo que ocurrió con la generación de la librería genómica (**Figura 21a**)

### **VI.3. Transformación de células electrocompetentes y arreglo de colonias:**

Mandel e Higa (1970) introdujeron DNA del bacteriófago  $\lambda$  en células de *E coli* tratadas con cloruro de calcio, de ahí en adelante los métodos para la transformación bacteriana han sido mejorados. La eficiencia en la introducción de DNA foráneo dentro de una bacteria es un fenómeno de mucha importancia en la biología molecular (Dower *et al.*, 1988). Existen dos métodos de transformación: la química y la electroporación. La transformación química es realizada mediante choque térmico y la electroporación involucra la exposición de células a un campo de pulso eléctrico,

creando poros en la pared celular que permite la introducción de DNA foráneo (Chu *et al.*, 1987).

La transformación química no produce una elevada cantidad de colonias en comparación con el método de electroporación, cuya eficiencia puede ser de hasta 10 veces más y requiere de menos tiempo (Taketo, 1988), en la **Figura 22** se puede observar miles de colonias transformadas a partir de este método utilizando el kit de clonamiento TOPO TA, utilizado también de manera satisfactoria por Glenn y Schable, 2005.

#### **VI.4. Selección de colonias positivas:**

Los métodos de hibridación de colonias y de Southern Blot han sido utilizados en muchos estudios para seleccionar colonias positivas a partir de librerías genómicas enriquecidas (Kandpal *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1996; Lench *et al.*, 1996; Ostrander *et al.*, 1996; Connell *et al.*, 1998; Fischer y Bachmann 1998; Hamilton *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 2009, Ruan *et al.*, 2011).

Para detectar la presencia de la secuencia de interés en las dos selecciones se utilizó el kit de detección colorimétrica de la biotina. Este método tiene la característica de tener alta sensibilidad ya que puede detectar desde 0.03 pg de la secuencia de interés, otra característica importante es que la detección no es radioactiva. Este kit permitió detectar exitosamente la presencia de clones positivos a partir del método de hibridación de colonias (**Figura 24**) como también con el método de Southern Blot (**Figura 26**). Sin embargo en la segunda selección se obtuvo que algunos insertos no se tiñeron uniformemente pudiéndose notar como manchas en la membrana de nylon. A pesar de este problema, se pudieron seleccionar las colonias positivas exitosamente.

El análisis de insertos pequeños a partir de librerías genómicas ha sido el método tradicional para encontrar microsatélites en diversas especies, a pesar de ello, en general, para el Phylum Mollusca, se ha detectado un porcentaje pequeño de clones

positivos (0.1 – 0.64) con esta técnica (Zane *et al.*, 2002). No obstante, a partir del método de librerías genómicas enriquecidas se pudo obtener un elevado porcentaje de clones positivos (0.65 – 0.81) (**Tabla 1 y 2**). Zane *et al.*, 2002 señalan que existen un 50% de probabilidad de encontrar clones positivos redundantes a partir de este método. En el trabajo de Zhan *et al.*, 2009 se reportan un 46% de clones redundantes en el bivalvo *Chalmys farreri*. En el presente trabajo se evita esta redundancia al momento de seleccionar aquellas colonias cuyos insertos difieran en tamaño (**Figura 25**), no obstante, existe la posibilidad de estar perdiendo clones con insertos que tengan un tamaño parecido pero cuya secuencia no sean la misma.

#### **VI.5. DNA plasmídico de colonias para secuenciamiento:**

Koohi *et al.*, 2005 señalan que es importante obtener fragmentos menores de 1000 pares de bases ya que asegura un efectivo secuenciamiento de los clones positivos.

Como se mencionó, los fragmentos obtenidos a partir de la librería genómica enriquecida fueron en su mayoría de un tamaño entre 247 y 468 pares de bases aproximadamente, y que por competencia con fragmentos de mayor tamaño, lograron exitosamente ingresar a las células de *E. coli* al momento de la transformación bacteriana, esto se puede apreciar en la **Figura 25**.

Para poder obtener el DNA plasmídico en la segunda selección se utilizó el protocolo de lisis alcalina, este es un método simple y confiable que permite la extracción de DNA plasmídico parcialmente purificado pero apropiado para observar patrones de restricción en un gel (Birnboim y Doly, 1979). Uno de los objetivos de la segunda selección fue visualizar la presencia del inserto utilizando la enzima *Eco RI*, lo cual se logró satisfactoriamente empleando este protocolo como se observa en la **Figura 25**.

Sin embargo, cuando se requiere realizar una reacción de secuenciamiento el DNA plasmídico debe ser de alta calidad y debe ser estar lo más purificado posible. Es por ello, que se utilizó el protocolo de Birnboim y Doly (1979) modificado utilizando polietilenglicol (PEG) (Sambrook *et al.*, 1989). En soluciones que contienen altas

concentraciones de PEG, el DNA de alto peso molecular adquiere una forma compacta (Jordan *et al.*, 1972) lo que ayuda a obtener DNA plasmídico más purificado. Souer *et al.*, 2008 recomienda utilizar PEG de alto peso molecular con porcentajes mayores al 8%. Como se observa en la **Figura 27** se logró obtener exitosamente el DNA plasmídico de las colonias seleccionadas a partir de PEG 8000 al 13%.

## VII. CONCLUSIONES

- El método de TNES-urea seguido de precipitación diferencial con sales a partir de la gónada masculina permite obtener DNA de alta calidad en esta especie. Esto puede ser tomado como referencia cuando se requiera amplificar distintas regiones de su genoma.
- El método de librerías genómica enriquecidas es adecuado para obtener microsatélites a partir del genoma de concha de abanico.
- Se detectó con un elevado porcentaje de clones positivos con el motivo microsatélite "CAT".
- El vector pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> resultó muy eficiente para insertar los fragmentos obtenidos a partir de la librería genómica enriquecida.
- El kit de detección colorimétrica de la biotina permitió seleccionar adecuadamente los clones positivos a partir de la hibridación de colonias y el método de Southern Blot.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Para evitar la tinción del plásmido además del inserto, diluir el DNA plasmídico e incubar la reacción de digestión a 37°C por 12 horas con la enzima *Eco RI*
- Para evitar la presencia de manchas no uniformes en la membrana, incrementar el tiempo de bloqueo, lavado de la membrana y el volumen de las soluciones al momento de realizar la detección colorimétrica de la biotina en la segunda selección.
- Con la finalidad de obtener fragmentos de diversos tamaños representativos de todo el genoma de *Argopecten purpuratus*, se puede utilizar a la vez diversas enzimas de restricción que generen extremos romos, para este fin, se puede reemplazar el adaptador SAULA/SAULB (Armour *et al.*, 1994) por el universal SNX (Hamilton *et al.*, 1999) el cual posee extremos romos que evita el problema de complementariedad “sitio de restricción/adaptador”.
- Con el propósito de analizar un mayor número de colonias, se puede volver a realizar una transformación bacteriana a partir de la librería genómica enriquecida obtenida.
- Debido a la necesidad de disminuir el porcentaje de clones negativos, se puede realizar un segundo enriquecimiento de microsatélites a partir de la primera librería genómica enriquecida.
- Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de microsatélites, se puede utilizar un mayor número de sondas biotiniladas con distintos motivos, para ello, se requiere que posean una misma temperatura de hibridación.
- Finalmente, con el propósito de evaluar el polimorfismo de los microsatélites, se debe realizar el secuenciamiento de los clones seleccionados y diseñar cebadores a sus insertos.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMOUR, J. A. L., NEUMANN, R., GOBERT, S. y JEFFREYS, A. J. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*. 1994, vol. 3, p. 599-605.
2. ASAHIDA, T., KOBAYASHI, T., SAITOH, K. y NAKAYAMA, I. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish Sci*. 1996, vol. 62, p. 727-730.
3. ASTORGA, M.P. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (edit). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. 2008, p. 277-287.
4. BECKMANN, JS. y WEBER JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 1992, vol. 12, p. 627-631.
5. BIRNBOIM, HC. y DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979, vol. 7, p. 1513-1523.
6. BRAND, AR. Scallop ecology: distributions and behaviour. En: Shumway SE. (edit). *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Amsterdam: Elsevier Science. 2009, p. 515-584.
7. CHU, G., HAYAKAWA, H. y BERG, P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res*. 1987, vol. 15, p. 1311.
8. CISNEROS, R., BAUTISTA, J. y ARGÜLLES, J. Comparative growth of Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*) in suspended systems. *Ecol. apl*. 2008, vol. 7, p. 1-2.
9. CONNELL, JP., PAMMI, S., IQBAL, MJ. HUIZINGA, T. y REDDY, AS. A high throughput procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes. *Plant Molecular Biology Report*. 1998, vol. 16, p. 341-349.



10. CRUZ F., PÉREZ M. y PRESA P. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene*. 2005, vol. 346, p. 241-247.
11. DIJKSTRA, H.H. y MAESTRATI, P. New bathyal species and records of Pectinoidea (Bivalvia: Propeamussiidae and Pectinidae) from Taiwan. *Bulletin of Malacology*. 2009, 37-54.
12. DOWER, WJ., MILLER, JF. y RAGSDALE, CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*. 1988, vol. 16, p. 6127-6145.
13. EDWARDS, KJ., BARKER, JH., DALY, A., JONES, C. y KARP, A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques*. 1996, vol. 20, p. 758-760.
14. ELGAR, G., CLARK, M.S., MEEK, S., SMITH, S., WARNER, S., EDWARDS, Y. J. K., BOUCHIREB, N., COTTAGE, A., YEO, G. S. H., UMRANIA, Y., WILLIAMS, G. y BRENNER, S. Generation and analysis of 25 Mb of Genomic DNA from the Pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning. *Genome Res*. 1999, vol. 9, p. 960-971.
15. ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2004, vol. 5, p. 435-445.
16. FISCHER, D. y BACHMANN, K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques*. 1998, vol. 24, p. 796-802.
17. FLEISCHER, R. C. y LOEW S. Construction and screening of microsatellite enriched genomic libraries. En: J. Ferraris y S. Palumbi (edit). *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. 1995, p. 459-468.
18. GLENN, TC. y SCHABLE, NA. Isolating microsatellite DNA loci. En: Zimmer EA. y Roalson EH (edit). *Methods in Enzymology 395, Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B*. Academic Press, San Diego, CA. 2005, p. 202-222.
19. HAMADA, H., PETRINO, MG. y KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982, vol. 79, p. 6465-6469.

20. HAMILTON, M. B., PINCUS, E. L., DI FIORE, A., y FLEISCHER R. C. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*. 1999, vol. 27, p. 500-504.
21. HAYE, P. A., SEGOVIA, N. I. y GALLARDO-ESCÁRATE, C. Novel microsatellite loci for the Chilean northern scallop *Argopecten purpuratus*. *Molecular Ecology Resources*. 2012, vol. 12, p. 185-189.
22. HOLMBERG, A., BLOMSTERGREN, A., NORD, O., LUKACS, M. y LUNDEBERG, J. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*. 2005, vol. 26, p. 501-510.
23. HUI, M., BAO, Z. M., ZHAN, A. B., HU, X. L., LU, W., CHANG, D. y JINGJIE, HU. Ten polymorphic dinucleotide microsatellite markers of the noble scallop *Chlamys nobilis*. *Mol. Ecol. Notes*. 2006, vol. 6, p. 1033-1035.
24. JORDAN, CF., LERMAN, LS. y VENABLE, JH. Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions. *Nat New Biol*. 1972, vol. 236(64), p. 67-70.
25. KANDPAL, RP., KANDPAL, G. y WEISSMAN, SM. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceeding National Academy of Sciences, USA*. 1994, vol. 91, p. 88-92.
26. KIJAS, JM., FOWLER, JC., GARBETT, CA. y THOMAS MR. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques*. 1994, vol 16(4), p. 656-660, 662.
27. KOOHI, M., BAHAR M., SEYED-TABATABAEI, BE. y PARTOW S. Identification and Isolation of Microsatellite in Pomegranates (*Punica granatum* L.) for Evaluation of Iranian genotypes. En: 4th National Biotechnology Congress of Iran. Iran, Agosto 2005.

28. LAGERCRANTZ, U., ELLEGREN, H. y ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 1993, vol. 21, p. 1111 - 1115.
29. LENCH, NJ., NORRIS, A., BAILE, A., BOOTH, A. y MARKHAM AF. Vectorette PCR isolation of microsatellite repeat sequences using anchored dinucleotide primers. *Nucleic Acids Research.* 1996, vol. 24, p. 2190-2191.
30. LITT, M., y LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1989, vol. 44, p. 397-401.
31. MANDEL, M. y HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 1970, vol. 53(1), p. 159-62.
32. MANDIOLA-QUILILONGO, CJ., RÍOS-RAMÍREZ, MA., VELÁSQUEZ-CUMPLIDO, L., MORALES-MUÑOZ, B. y ESCOBAR-FICA, JA. Development and characterization of ten polymorphic microsatellites isolated from the scallop *Argopecten purpuratus*. *J Genet.* 2012, vol. 91(1), p. e12-4.
33. MARÍN, A., FUJIMOTO, T. y ARAI, K. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* and cross-species amplification in other scallop species (family Pectinidae). 2012, vol. 4, p. 179-182.
34. MENDO, J., WOLFF, M., CARBAJAL, W., GONZÁLES, I. y BADJECK, M. Manejo y explotación de los principales bancos naturales de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la costa Peruana. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (edit). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. 2008, p. 101–114.
35. MILLER, SA., DYKES, DD. y POLESKY, HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988, vol. 16, p. 1215.

36. MORAGAT, D., AVENDAÑO, M., PEÑA J., LE, PENNECT M., TANGUYT, A. y BARON, J. Genetic and morfological differentiation between two pectinid populations of *Argopecten purpuratus* from the northern chilean coast. *Estud. Oceanol.* 2001, vol. 20, p. 51-60.
37. NUNOME, T., NEGORO, S. MIYATAKE, K., YAMAGUCHI, K., y FUKUOKA, H. A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2006, Vol. 24, p. 305-312.
38. OSORIO, C. y BAHAMONDE, N. Moluscos bivalvos. *Biología Pesquera Chile*. 1986, vol. 3, p. 69–128.
39. OSTRANDER, EA., JONG, PM. y DUYK, G. Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceeding National Academy of Sciences, USA*. 1992, vol. 89, p. 3419-3434.
40. PACHECO, A. y GARATE, A. Bioincrustantes en estructuras de cultivo de *Argopecten purpuratus* en Bahía Samanco, Perú. *Ecología Aplicada*. 2005, vol. 4, n°1 y 2, p.149-152.
41. PARENRENGI, A. Study on Genetic Varibility of Groupers (*Epinephelis* spp.) from Malaysia and Indonesian Waters Using PCR-RAPD Analysis. *Faculty Science and Technology, University Putra Malaysia*. 2001.
42. PICKERELL, T., MCCONNELL, SJ. y SKIBINSKI D. Isolation and characterization of three microsatellite loci from the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *ANNALES ZOOLOGICI FENNICI*. 2004, vol. 41(2), p. 455-457.
43. PRIMMER, CR., RAUDSEPP, T., CHOWDHARY, BP., MOLLER, AP. y ELLEGREN, H. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Res*. 1997, vol. 7, p. 471-482.
44. PUSLEDNIK, L. y SERB, JM. Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and the effect of outgroup selection and increased taxon sampling on tree topology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008, vol. 48, p. 1178-1188.

45. RASSMANN, K., SCHLOTTERER, C. y TAUTZ, D. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*. 1991, vol. 12, p. 113 - 118.
46. RICO, C., RICO, I. y HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. Lond, B, Biol. Sci.*. 1996, vol. 263, p. 549-557.
47. RUAN, X., WANG, W., KONG, J. y HU, J. Isolation and analysis of microsatellites in the genome of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *African Journal of Biotechnology*. 2011, vol. 10(4), p. 507-518.
48. SAAVEDRA, C. y BACHERE, E. Bivalve genomics. *Aquaculture*. 2006, vol. 256(1-4), p. 1-14.
49. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
50. SAUER, ML., KOLLARS, B., GERAETS, R. y SUTTON, F. Sequential CaCl<sub>2</sub>, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. *Source Plant Science Department, South Dakota State University, Brookings, SD 57007, USA*. 2008, vol. 380(2), p. 310-4.
51. SCHILTHUIZEN, M. Mollusca: an evolutionary cornucopia. *Trends Ecol. Evol.* 2002, vol. 17, p. 8 -9.
52. SUN, C. S., ZHAN, A. B., HUI, M., LU, W., HU, X. L., HU, J. J. y BAO, Z. Characterization of novel microsatellite markers from the Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Mol. Ecol. Notes*. 2007, vol. 7, p. 106-108.
53. TAKETO, A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta*. 1988, vol. 949, p. 318-324.
54. TARAZONA, J., ESPINOZA, R., SOLIS, M. y ARNTZ, W. Crecimiento y producción somática de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía

- Independencia, Pisco (Perú) comparados entre eventos El Niño y La Niña. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2007, vol. 42, n°3, p. 275-285.
55. TAUTZ, D., TRICK, M. y DOVER, GA. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature. 1986, vol. 322, p. 652-656.
  56. VILDOSO, A. y CHIRICHIGNO, N. Contribución al estudio de la concha de abanico, *Argopecten purpuratus*, en Perú. Pesca y Caza. 1956, vol. 7, p. 126
  57. WALLER, T. R. Evolutionary relationships among commercial scallops (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). En: Shumway SE. (edit). 1992, p. 1–73
  58. WEBER, J. L. y MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 1989, vol. 44, p. 388-396.
  59. WOLFF, M. Abundancia masiva y crecimiento de pre-adultos de la concha de abanico Peruana (*Argopecten purpuratus*) en la zona de Pisco bajo condiciones de "El Niño". En: Arntz, W., A. Landa y J. Tarazona (edit.). "El Niño" y su impacto en la fauna marina. Bol. Inst. Mar Perú-Callao, 1985. vol extr, p. 87-90.
  60. WOLFF, M. y MENDO, J. El impacto de El Niño sobre la producción de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco, Perú. Ecología aplicada. 2003, vol. 2, n°1, p. 51-57.
  61. WOLFF, M. y MENDO, J. Management of the Peruvian bay scallop (*Argopecten purpuratus*) metapopulation with regard to environmental change. Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 2000, vol. 10, p. 117-126.
  62. XIN, D., XIN-BO, C., SONG-HUA, L., XIAO-CHUN, W., YUAN, G., DONG-FENG, H., JIN, W. y YU-FU, W. Microsatellite Marker Enrichment with Magnetic Beads in Flax. Acta Agronomica Sinica. 2008. Vol. 34, p. 2099-2105.
  63. ZANE, L., BARGELLONI, L. y PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol. Ecol. 2002, vol. 11, p. 1-16.

64. ZHAN, A. B., BAO, Z. M., WANG, X. L. y HU, J. J. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. Fish. Sci. 2005, vol. 71, p. 1341- 1346.
65. ZHAN, A., BAO, Z., HU, X., LU, W. y HU, J. Methods comparison for microsatellite marker development: Different isolation methods, different yield efficiency. Journal of Ocean University of China. 2009, vol. 8, p. 161-5.
66. ZHANG, L. L., BAO, Z. M., CHENG, J., LI, H., HUANG, X. T., WANG, S., ZHANG, C. y HU, J. Fosmid library construction and initial analysis of end sequences in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). 2007, vol. 9, p. 606-612.

## ANEXOS

### ANEXO I - COMPOSICION DE SOLUCIONES:

1. Buffer TE 10:1

Tris 10mM y EDTA 1 mM pH de 7.4.

2. Buffer TNES-urea

Tris - HCl 10 mM pH de 8.0, NaCl 125 mM, EDTA 10 mM pH 8.0, SDS 0.5% y urea 4 M.

3. Buffer TE 20:5

Tris 20mM y EDTA 5 mM pH de 7.4.

4. Buffer Church

BSA 1%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0.5 M pH de 7.2 y SDS 7%.

5. Buffer Bind and Wash (B&W)

Tris 10mM, EDTA y 1 mM y NaCl 1 M.

6. Buffer de transferencia alcalina

NaOH 0.4 N y NaCl 1 M.

7. Buffer de neutralización

Tris - HCl 0.5 M pH 7.2 y NaCl 1 M

8. Buffer GET

Glucosa 50mM, EDTA 10mM y Tris 25mM pH de 8.0

9. Solución salina de citrato de sodio (SSC)

NaCl 150 mM y Citrato de sodio 150 mM

10. Solución de denaturación

NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M

11. Solución de neutralización

NaCl 1.5 M y Tris-HCl 1 M pH 7.4.

12. Solución I

Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, y Tris 25 mM pH de 8.0



13. Solución II

NaOH 0.2 N y SDS 1%

14. Solución III

Acetato de potasio 3 M y de Ácido acético glacial 2 M

**ANEXO II - COMPOSICION MEDIOS DE CULTIVO:**

1. SOC

Extracto de levadura 0.5%, Triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.

2. Luria - Bertani (LB) sólido

Triptona 1%, 0 extracto de levadura 5%, NaCl 1% y 15 g/L de agar agar

3. Luria - Bertani (LB) líquido

Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%